

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

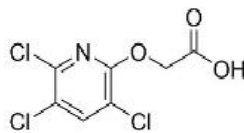
ΠΜΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

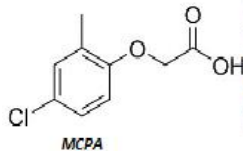
ΧΡΗΣΗ ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ *LACTOBACILLUS BREVIS* ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

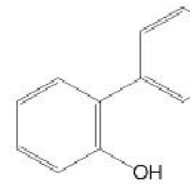
ΕΛΕΝΗ ΒΙΚΕΛΗ



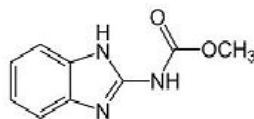
Triclopyr



MCPA



OPP



Carbendazim

ΑΘΗΝΑ 2014

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Τμήμα Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2013-2014 υπό την άμεση και διαρκή επίβλεψη του Καθηγητή κ. Σπυρίδωνα Κίντζιου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Σπυρίδωνα Κίντζιο, για την εμπιστοσύνη και το ενδιαφέρον που έδειξε τόσο κατά την ανάθεση της εργασίας, όσο και κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των μαθημάτων του μεταπτυχιακού προγράμματος. Θα ήθελα επίσης να τον ευχαριστήσω για τη συμπαράσταση και την καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τους υποψήφιους διδάκτορες Θεοφύλακτο Αποστόλου και Ευαγγελία Φλαμπούρη και την διδακτορική ερευνήτρια Σοφία Μαυρίκου για το αμείωτο ενδιαφέρον τους, καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου για τη βοήθεια τους σε οτιδήποτε προβλήματα προέκυπταν.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Επίκουρους Καθηγητές κα. Δ. Μηλιώνη και τον κ. Π. Σκανδάμη για την συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή, δίνοντας μου τη δυνατότητα να πραγματοποιήσω την παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη. Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Γρηγόρη Καλτσά, Καθηγητή του Τμήματος Ηλεκτρονικής του Τεχνολογικού Ιδρύματος Αθηνών αλλά και στους συνεργάτες του, για την κατασκευή της συσκευής microSENSESlab με την οποία πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις. Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια κα. Ε. Τσακαλίδου, Διευθύντρια του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για την παροχή του βιολογικού υλικού, που αποτέλεσε ένα από τα βασικά κομμάτια της έρευνας μου. Τα αντισώματα κατά των μελετηθέντων φυτοφαρμακευτικών ουσιών έγινε από την ομάδα της Δρ. Ε. Λιβανίου (Ινστιτούτο Ραδιοϊσοτόπων και Ραδ/κών Προϊόντων, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος) την οποία επίσης ευχαριστώ.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την μητέρα μου Μαρία και την αδερφή μου Δήμητρα, καθώς και όλους όσοι στηρίζουν τις προσπάθειές μου καθ' όλη τη διάρκεια των μαθητικών αλλά και ακαδημαϊκών μου σπουδών.

Ανάθεση

Η ανάθεση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης έγινε με απόφαση της συνέλευσης 11/13-06-2014 του Τμήματος Βιοτεχνολογίας κατά την οποία εγκρίθηκαν το θέμα και η τριμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική επιτροπή.

Συμβουλευτική και Εξεταστική επιτροπή:

Καθηγητής Σπυρίδων Κίντζιος (Επιβλέπων)

Δ. Μηλιώνη Επ. Καθηγήτρια

Π. Σκανδάμης , Επ. Καθηγητής

ΑΘΗΝΑ 2014

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1. Εισαγωγή στους αισθητήρες	8
2. Ταξινόμηση αισθητήρων	10
3. Χημικοί αισθητήρες	11
4. Εισαγωγή στους Βιοαισθητήρες	12
4.1 Ορισμός – Αρχή λειτουργίας βιοαισθητήρων	13
4.2. Ταξινόμηση βιοαισθητήρων.....	16
5. Κυτταρικοί Βιοαισθητήρες	23
5.1 Τύποι κυτταρικών βιοαισθητήρων.....	24
6. Μέθοδος Βιοηλεκτρικής Αναγνώρισης (Bioelectric Recognition Assay – BERA)	25
7. Μembrανική Μηχανική και Τεχνική της Ηλεκτρόπρωσης.....	28
8. Βακτήρια <i>Lactobacillus brevis</i>	31
9. Φυτοφάρμακα	34
9.1 Carbendazim(Methyl 1H-benzimidazol-2-ylcarbamate).....	34
9.2 MCPA(4-Chloro-2-methylphenoxyacetic acid)	34
9.3 OPP(o-phenylphenol)	35
9.4 Triclopyr[(4-Chloro-2-methylphenoxy)acetic acid]	35
10. MRL και υπολειμματικότητα.....	35
11. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	36
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	37
Υλικά και Μέθοδοι.....	37
1 Εργαστηριακά υλικά και μηχανήματα.....	37
2 Αισθητήριο κυτταρικό υλικό.....	38
3 Μέθοδοι.....	40
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ.....	42
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	42
1 Πρότυπες Καμπύλες	42
2 Αποθηκευσιμότητα σε θερμοκρασία δωματίου(RT)	47
3 Αποθηκευσιμότητα σε θερμοκρασία ψυγείου(Ψ).....	50

4	Διδύναμοι βιοαισθητήρες.....	60
5	Cross-reactivity(c/r)	64
	ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	67
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	71

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία περιγράφεται η ανάπτυξη μια βασικής δομής κυτταρικού βιοαισθητήρα, βασιζόμενου στη μέθοδο Βιοηλεκτρικής Αναγνώρισης (Bioelectric Recognition Assay - BERA) ο οποίος θα μπορεί να ανιχνεύει σε ελάχιστο χρόνο και με ικανοποιητική ευαισθησία υπολείμματα από τα φυτοπροστατευτικά σκευάσματα: carbendazim, triclopyr, 2-orthopolyphenol και MCPA. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν μεμβρανικά τροποποιημένα βακτηριακά κύτταρα *Lactobacillus brevis.*, αποσκοπώντας στην ανάπτυξη κυτταρικών στοιχείων βιοαναγνώρισης με χαμηλότερο κόστος και υψηλή αποθηκευσιμότητα. Η διαδικασία της μεμβρανικής μηχανικής επιτυγχάνεται με την ηλεκτροεισαγωγή αντισωμάτων στις μεμβράνες των κυττάρων, μέσω της ηλεκτροπόρωσης.

Συνολικά μελετήθηκε η απόκριση των κυτταρικών βιοαισθητήρων σε συγκεντρώσεις MRL και 2X MRL, πέραν του μάρτυρα. Η ανίχνευση βασίστηκε στη μέτρηση των μεταβολών της ηλεκτρικής απόκρισης των τροποποιημένων κυττάρων, σύμφωνα με την αρχή λειτουργίας της μεθόδου BERA.

Συνοψίζοντας, αξίζει να αναφερθεί ότι τα αποτελέσματα της μεταπτυχιακής μελέτης αυτής προσφέρουν νέες προοπτικές στον τομέα των κυτταρικών βιοαισθητήρων για την ανάλυση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων. Έτσι δημιουργείται μία ακόμα προϋπόθεση για τη δυναμική ανάπτυξη οικονομικότερων και πρακτικότερων κυτταρικών βιοαισθητήρων σε εμπορική κλίμακα στην Ελλάδα.

ABSTRACT

In this study, we developed a cellular biosensor for the detection of residues of four(4) pesticides: carbendazim, triclopyr, 2-polyphenol and mcpa. The biosensor was based on the principle of the bioelectric recognition assay (BERA), with the purpose to detect the target analyte in minimum time and with adequate accuracy. For this purpose, we used membrane-engineered bacterial cells of *Lactobacillus brevis.*, in order to achieve low cost and high storability of the cellular biorecognition elements. The membrane-engineering process is achieved by mechanical electro insertion of antibodies in cell membrane using electroporation.

We studied the response of cell biosensors in two of the Minimum Residue Level (MRL) concentrations of pesticides, 1xMRL and 2xMRL. The detection of pesticides was based on the measurement of changes in electrical response of the modified cells according to the principle of the test BERA.

To sum up, it is worth mentioning that the results of this study give new perspectives at the field of cellular biosensors for the detection of pesticides residues. Thus, it sets the grounds for the potential development for less expensive and more practical cellular biosensors from the lab-scale to the commercial scale in Greece.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Εισαγωγή στους αισθητήρες

Η είσοδος στον 21ο αιώνα σηματοδοτεί την είσοδο στην “εποχή της πληροφορίας”. Η εμφάνιση νέων δυνατοτήτων ταυτόχρονου χειρισμού πολυάριθμων πηγών πληροφοριών, καθώς επίσης και εφαρμογής ιδιαίτερα αποτελεσματικών μεθόδων ταξινόμησης και ανάκτησης δεδομένων, δημιούργησαν νέες απαιτήσεις, στις ήδη υπάρχουσες μεθόδους άντλησης και επεξεργασίας πληροφοριών. Τη σημερινή εποχή, πλέον, είναι δυνατή η χρήση συστημάτων αντίληψης και μέτρησης, των λεγόμενων αισθητήρων, ικανών να μετρήσουν φυσικά μεγέθη, όπως θερμοκρασία, πίεση, ηλεκτρικό δυναμικό, ένταση φωτός, ιξώδες. Οι φυσικοί αισθητήρες, όπως αυτοί που απαντώνται στους ζωντανούς οργανισμούς, συνήθως αποκρίνονται σε ερεθίσματα ηλεκτροχημικού χαρακτήρα, δηλαδή η λειτουργία τους βασίζεται στη μεταφορά ιόντων, όπως συμβαίνει στις νευρικές ίνες. Οι πρώτοι αισθητήρες και όργανα μέτρησης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μηχανικής φύσεως. Η συστηματική μελέτη του ηλεκτρισμού, οδήγησε στην ανάπτυξη νέων αισθητήρων, ηλεκτρικής φύσεως, οι οποίοι οδηγούσαν στην παραγωγή αναλογικού σήματος. Στους τεχνητούς αισθητήρες, η μετάδοση των πληροφοριών διεξάγεται υπό ηλεκτρική μορφή επίσης, αλλά και μέσω της μεταφοράς ηλεκτρονίων [Fraden, 2004; Taylor - Schultz, 1996]. Σημαντική ώθηση στην εξέλιξη των αισθητήρων έδωσε η ανάγκη εξέλιξης της τεχνολογίας, καθώς και αντιμετώπισης και επίλυσης ποικίλων προβλημάτων της σύγχρονης έρευνας στο πεδίο των θετικών επιστημών. Οι αισθητήρες είναι ένα από τα βασικότερα στοιχεία των σύγχρονων συστημάτων, δεδομένου ότι καθορίζουν την ποιότητα των πληροφοριών που προκύπτουν από την πραγματική ζωή και χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο και τη λήψη καθοριστικών αποφάσεων. Αποτελούν ζωτικής σημασίας τμήμα των περισσοτέρων βιομηχανικών οργάνων, οργάνων μεταφοράς κ.α. και ο ρόλος τους στα περιβαλλοντικά συστήματα, στα συστήματα υγείας και σε άλλους τομείς, γίνεται όλο και πιο σημαντικός. Η παγκόσμια αγορά αισθητήρων αναπτύσσεται γρήγορα και ο βαθμός καινοτομίας είναι εξαιρετικά υψηλός. Οι αισθητήρες, οι οποίοι λειτουργούν με βάση τις νέες αρχές και βασίζονται στην χρήση νέων υλικών και καινοτόμων τεχνολογικών μεθόδων, είναι ακριβέστεροι, γρηγορότεροι, μικρότερου μεγέθους, χαμηλότερης ισχύος και οικονομικότεροι. Η έρευνα στη νανοτεχνολογία και στην βιοτεχνολογία θα συμβάλλει σημαντικά, στην βελτίωση των ήδη υπαρχόντων εξελιγμένων αισθητήρων και στην εμφάνιση των μελλοντικών.

Ο αισθητήρας ορίζεται ως μια συσκευή η οποία ανιχνεύει ένα μακροσκοπικό φυσικό μέγεθος και το μετατρέπει σε ηλεκτρικά μετρήσιμο, συγκεκριμένων χαρακτηριστικών, το οποίο ύστερα από επεξεργασία παίρνει την μορφή τυποποιημένου σήματος. Οποιαδήποτε μορφή

ενέργειας δεχθεί μια τέτοια συσκευή, (χημική, μηχανική, θερμική, μαγνητική), την μετατρέπει σε μορφή ηλεκτρικής ενέργειας, [Middelhoek - Noorlag, 1981]. Η διαδικασία ανίχνευσης από τους αισθητήρες, αποτελεί μια διαδικασία μεταφοράς πληροφοριών και κάθε τέτοια μετάδοση πληροφοριών απαιτεί την μετάδοση ενέργειας [Fraden, 2004; Makinwa, 2008]. Στοιχείο εισόδου ενός αισθητήρα είναι το ερέθισμα που λαμβάνει, το οποίο μπορεί να είναι κάποια μετρούμενη ποσότητα, κάποια ιδιότητα ή κάποια κατάσταση, η οποία μπορεί να γίνει αντιληπτή και να μετατραπεί σε ηλεκτρικό σήμα, ενώ το σήμα εξόδου, μπορεί να έχει τη μορφή τάσης, ηλεκτρικού φορτίου ή ρεύματος [Lambrechts - Sansen, 1992].

Τα βασικά στοιχεία που απαρτίζουν ένα αισθητήρα είναι μια ενεργός επιφάνεια, (active surface), ένας μετατροπέας σήματος, (transducer) και ένα ηλεκτρονικό τμήμα. Η ενεργός επιφάνεια ενός αισθητήρα αποτελείται από το συστατικό αναγνώρισης, (recognition element), που πραγματοποιεί την ανίχνευση και το οποίο μπορεί να είναι κάποιο ακινητοποιημένο βιομόριο ή στρώμα πολυμερών. Το συστατικό αναγνώρισης είναι ένα βασικό τμήμα για κάθε αισθητήρα, καθώς ενισχύει την ικανότητα της συσκευής να αντιδράσει επιλεκτικά με κάποια συγκεκριμένη αναλυτέα ουσία ή με μια επιθυμητή ομάδα συστατικών, αποφεύγοντας έτσι την ανεπιθύμητη αλληλεπίδραση με άλλα συστατικά. Ο μετατροπέας σήματος, είναι μια συσκευή που ανιχνεύει την αλληλεπίδραση ανάμεσα στην ενεργό επιφάνεια και την προς μέτρηση ουσία και μετατρέπει την παρατηρούμενη μεταβολή, (φυσική, χημική), σε μετρήσιμο σήμα [Eggins, 2002]. Η μεταβολή που λαμβάνει χώρα στον μετατροπέα σήματος και που οφείλεται στην παρουσία της ενεργού επιφάνειας, εκφράζεται ως ένα συγκεκριμένο σήμα, το οποίο δύναται να συμπεριλαμβάνει μεταβολές μεγεθών, όπως είναι η σύνθετη αντίσταση, η τάση, η ένταση του φωτός, η ανάκλαση, το βάρος, η θερμοκρασία, κ.α. Ο μετατροπέας σήματος, αποτελεί το δυσκολότερο και πιο κρίσιμο τμήμα ενός αισθητήρα, καθώς η ποιότητα και η αρχή κατασκευής του καθορίζουν και τα χαρακτηριστικά του αισθητήρα. Για να γίνει δυνατή η κατασκευή ενός μετατροπέα σήματος κάποιου μακροσκοπικού μεγέθους, θα πρέπει να κατασκευαστεί μια δομή στην οποία οι μεταβολές του μακροσκοπικού μεγέθους θα μπορούν να επιφέρουν μεταβολή σε κάποιο ηλεκτρικά μετρήσιμο μέγεθος. Ένας μετατροπέας από μόνος του δεν αποτελεί μια ιδιαίτερα αξιόπιστη λύση σαν αισθητήρας, καθώς τα ηλεκτρικά σήματα τα οποία συνήθως παράγει είναι πολύ μικρής έντασης και έτσι τις περισσότερες φορές είναι δύσκολα μετρήσιμα. Σαν μια ελάχιστη διαμόρφωση θα μπορούσε να θεωρηθεί η χρήση ενός μετατροπέα μαζί με ένα μεταλλάκτη, ώστε να προκύψει ένα πιο σταθερό σήμα, κάτι το οποίο δεν είναι επίσης αρκετό, εάν ληφθούν υπόψη οι διακυμάνσεις της τάσης ή η μεταβολή της θερμοκρασίας. Ο όρος αισθητήρας πρέπει να διαχωρίζεται από τον όρο μετατροπέα. Ο μετατροπέας μετατρέπει ένα

τύπο ενέργειας σε κάποιον άλλο, ενώ ο αισθητήρας μετατρέπει κάθε τύπο ενέργειας σε ηλεκτρική. Τέλος, το ηλεκτρικό τμήμα του αισθητήρα είναι υπεύθυνο για την επεξεργασία και την ενίσχυση του παραγόμενου σήματος.

Οι αισθητήρες βαθμονομούνται με εφαρμογή γνωστών φυσικών μεγεθών και καταγραφή της απόκρισης του συστήματος. Τα χαρακτηριστικά ενός αισθητήρα καθορίζουν την απόδοση του, τη σταθερότητα της λειτουργίας του και την ταχύτητα της απόκρισης του στα ερεθίσματα που δέχεται. Τα χαρακτηριστικά αυτά μπορεί να είναι είτε στατικά, είτε δυναμικά.

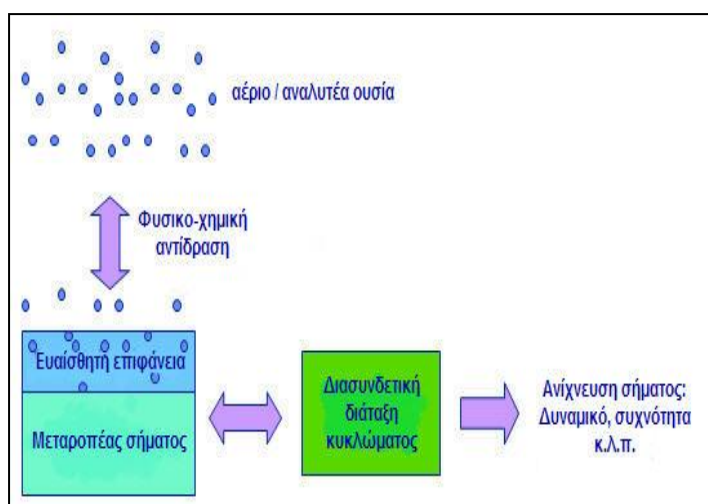
Τα στατικά χαρακτηριστικά ενός αισθητήρα καθορίζουν την απόδοσή του σε μια σταθερή κατάσταση και είναι τα ακόλουθα: η πιστότητα, η ικανότητα ακρίβειας, επαναληψιμότητας, αναπαραγωγιμότητας των αποτελεσμάτων, η διακριτική ικανότητα, η μονοτονικότητα της συνάρτησης μεταφοράς, η ευαισθησία στην μέτρηση και στην διαταραχή, η γραμμική απόκριση, η πλήρης κλίμακα εισόδου και εξόδου, η υστέρηση, το εύρος, το σφάλμα μη γραμμικότητας, τα σφάλματα βαθμονόμησης και τέλος τα συστηματικά και τυχαία σφάλματα. Εκτός από τα στατικά χαρακτηριστικά, τα οποία αναφέρονται στην περίπτωση εκείνη όπου έχει επέλθει ισορροπία μεταξύ σήματος εξόδου και αισθητήρα, δηλαδή όταν τα σήματα εισόδου και εξόδου δεν μεταβάλλονται πλέον συναρτήσει του χρόνου, κάθε αισθητήρας διαθέτει και δυναμικά χαρακτηριστικά. Τα δυναμικά αυτά χαρακτηριστικά περιγράφουν την συμπεριφορά του αισθητήρα μεταξύ της χρονικής εκείνης στιγμής, κατά την οποία το σήμα εισόδου μεταβάλλεται, έως την χρονική στιγμή που το σήμα εξόδου σταθεροποιείται εκ νέου. Τα δυναμικά όπως και τα στατικά χαρακτηριστικά ισχύουν εντός κάποιου συγκεκριμένου εύρους συνθηκών λειτουργίας του αισθητήρα και εάν ο αισθητήρας βρεθεί εκτός αυτού του εύρους, τότε τα δυναμικά χαρακτηριστικά δύνανται να μεταβληθούν.

2. Ταξινόμηση αισθητήρων

Η ταξινόμηση των αισθητήρων μπορεί να γίνει με βάση τη λειτουργία που επιτελούν, (μέτρηση πίεσης, θερμοκρασίας), τη φυσική αρχή στην οποία στηρίζεται η λειτουργία τους ή τον τύπο του μεταγωγέα σήματος που διαθέτουν, [Janata - Bezegh, 1988]. Βάσει της κύριας μορφής ενέργειας που μεταφέρει το σήμα τους, κατηγοριοποιούνται σε: i) μηχανικούς, ii) θερμικούς, iii) ηλεκτρικούς, iv) μαγνητικούς, v) ακτινοβολίας και vi) (βιο)χημικούς [Hulanicki et.al., 1991].

3. Χημικοί αισθητήρες

Ένας από τους τομείς της Αναλυτικής Χημείας με ιδιαίτερη ανάπτυξη τα τελευταία χρόνια είναι οι χημικοί αισθητήρες. Αυτή η νέα γενιά αισθητήρων, αποτελεί μια πολύπλοκη επέκταση συστημάτων μέτρησης των φυσικών αισθητήρων. Οι χημικοί αισθητήρες ορίζονται ως συσκευές οι οποίες αντιδρούν με μια συγκεκριμένη αναλυτέα ουσία, με ένα συγκεκριμένο τρόπο, μέσω κάποιας χημικής αντίδρασης και χρησιμοποιούνται για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό της αναλυτέας αυτής ουσίας. Η ίδια η παρουσία της αναλυόμενης ουσίας στην επιφάνεια της συσκευής θα μεταφέρει ποιοτική αναλυτική πληροφορία, ενώ ο αριθμός των θέσεων που καταλαμβάνονται από μια τέτοια ουσία θα αποδώσει ένα ποσοτικό αποτέλεσμα. Τα όργανα αυτά έχουν την ικανότητα για την συνεχή και άμεση εξαγωγή των πληροφοριών που αφορούν τη χημική σύσταση ενός δείγματος. Στόχος τους είναι η αναγνώριση και η επιλογή μιας αναλυόμενης ουσίας (ή μιας ομάδας χημικών ουσιών), η οποία είναι παρούσα είτε μέσα στην αέρια είτε μέσα στην υγρή φάση πιθανότατα συνδυασμένη με μεγάλη ποικιλία άλλων ουσιών [Eggins, 2002].



Σχήμα 1.1 Γενικό μοντέλο λειτουργίας των χημικών αισθητήρων [Bedair Fedder,2000].

Οι χημικοί αισθητήρες αποτελούνται από δύο κύρια μέρη: α) ένα χημικά ευαίσθητο στρώμα (το τμήμα του αισθητήρα που είναι υπεύθυνο για την χημική αναγνώριση) και β) ένα μετατροπέα σήματος, ο οποίος μετατρέπει τη χημική πληροφορία που δέχεται σε ηλεκτρικό ή οπτικό σήμα, (Σχήμα 1.1) [Bedair – Fedder,2000]. Η ενεργός επιφάνεια, όπου πραγματοποιείται η αντίδραση, μπορεί να είναι κάποιο στρώμα πολυμερών ή στρώμα εμπλουτισμένο με κάποιο χημικό παράγοντα ή επιστρωμένο με υλικό, (συνήθως μικρού μοριακού βάρους), μη βιολογικής φύσεως. Τα στρώματα αυτών των πολυμερών ή οι συγκεκριμένες χημικές ουσίες που βρίσκονται προσκολλημένες είτε στην ενεργό επιφάνεια είτε απευθείας στον μετατροπέα

σήματος, αλληλεπιδρούν και υπολογίζουν την επιθυμητή αναλυτέα ουσία. Ο ρόλος του μετατροπέα σήματος, είναι η μετάφραση της παρουσίας της επιλεγμένης αναλυόμενης ουσίας σε ανιχνεύσιμο σήμα το οποίο θα μπορεί με τη σειρά του να συλλεχθεί και να ερμηνευθεί [Taylor - Schultz, 1996]. Οι πιθανές εφαρμογές της τεχνολογίας του χημικού αισθητήρα είναι πολυάριθμες και παραδείγματα αυτών αποτελούν περιβαλλοντικοί έλεγχοι, όπως ανίχνευση δηλητηριωδών αερίων, η ανάλυση αερίων καυσίμων, ο καθορισμός των ιόντων στο πόσιμο νερό, κ.α.

Στην οικογένεια των χημικών αισθητήρων, εντάσσονται οι βιοαισθητήρες. Στους βιοαισθητήρες, σε αντίθεση με τους υπόλοιπους χημικούς αισθητήρες, η ενεργός επιφάνεια αναγνώρισης μπορεί να είναι κάποιο βιολογικό μόριο, (όπως κάποιο ένζυμο, αντίσωμα ή υποδοχέας) ή κύτταρο. Ο συνδυασμός της βιολογικής αναγνώρισης με την φυσικοχημική μετατροπή του σήματος, δίνει τη δυνατότητα στους βιοαισθητήρες να παρέχουν την ευαισθησία των χημικών αισθητήρων και ταυτόχρονα την πολύ καλή επιλεκτικότητα (εκλεκτικότητα) των βιολογικών αναγνωριστικών μηχανισμών.

4. Εισαγωγή στους Βιοαισθητήρες

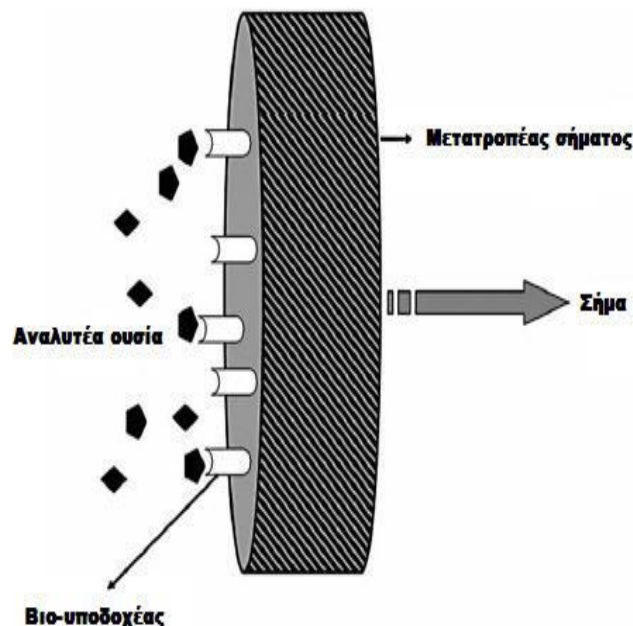
Η μοντέρνα ιδέα των βιοαισθητήρων, η οποία διαδέχεται την ανακάλυψη των Clark και Lyons το 1962, ενός απλού, γρήγορου και μεγάλης ακρίβειας βιοαισθητήρα γλυκόζης, αντιπροσωπεύει ένα νέο, ραγδαία διευρυνόμενο, πεδίο το οποίο περιλαμβάνει την χρήση καινοτόμων συστημάτων για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης συστατικών και άλλων παραμέτρων βιολογικού ενδιαφέροντος. Τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα των νέων αυτών εργαλείων έρευνας, με εφαρμογή στην βιολογική, κλινική και τοξικολογική έρευνα, είναι η αυξημένη ταχύτητα λειτουργίας και απόδοσης, το μικρότερο μέγεθος, το μειωμένο κόστος και η αυξημένη ευαισθησία και ακρίβεια των οργάνων αυτών. Τα τελευταία χρόνια, αναπτύσσεται ιδιαίτερο ενδιαφέρον γύρω από τον σχεδιασμό, την κατασκευή και την χρήση τέτοιων μεθόδων και ειδικά τις τελευταίες δύο δεκαετίες οι δημοσιεύσεις επιστημονικών εργασιών αλλά και βιβλίων που πραγματεύονται την ανάπτυξη και εφαρμογή τους αυξάνονται εντυπωσιακά. Οι βιοαισθητήρες χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση χημικών ουσιών ή και βιολογικών παραγόντων στον ανθρώπινο οργανισμό και σε περιβαλλοντικά συστήματα, (φυτά, ζώα, H₂O). Είναι γεγονός ότι έχει αρχίσει να αναγνωρίζεται η επιστημονική σπουδαιότητα τους, ως αξιόπιστες μικροσυσκευές, οι οποίες δύνανται να διεξάγουν εξεζητημένους ελέγχους που αποτελούν αντικείμενο πολλών επιστημονικών πεδίων, όπως της νανοβιοτεχνολογίας,

βιολογίας, κ.α. Οι εξειδικευμένες γνώσεις επιστημόνων από τα πεδία της αναλυτικής χημείας, βιοχημείας, βιοτεχνολογίας, φυσικής, περιβάλλοντος, υγείας, καθώς και η συμβολή εξειδικευμένων ειδικών, είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη των βιοαισθητήρων [Mehrnar - Abdi, 2004]. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον, παρουσιάζει η χρήση των βιοαισθητήρων στον τομέα της τοξικολογίας, των περιβαλλοντικών μελετών και των ταχέων διαγνωστικών αναλύσεων. Η τάση μείωσης του μεγέθους των διατάξεων αυτών, σε κλίμακα νανομέτρων, καθιστά ικανή την μελέτη των βιολογικών συστημάτων, η οποία αλλάζει δραματικά την άποψη που επικρατεί σχετικά με τα λειτουργικά βιολογικά συστήματα και τον αντίκτυπο που έχουν τα τοξικά συστατικά σε αυτά [Zieziulewicz et.al., 2003]. Ο βιοαισθητήρας που επέδειξαν οι Clark και Lyons, αποτέλεσε την βάση για τον σχεδιασμό των βιοαισθητήρων πρώτης γενιάς. Η ανάπτυξη τέτοιων παρόμοιων εργαλείων και τεχνικών ανίχνευσης, χαρακτηρίστηκε από αξιοσημείωτη εξέλιξη. Στους βιοαισθητήρες που ακολούθησαν, γνωστούς και ως βιοαισθητήρες δεύτερης γενιάς, η ανάλυση των χημικών και βιολογικών ειδών γινόταν με την χρήση ενδιάμεσων εξειδικευμένων αντιδραστηρίων για την ενίσχυση της ευαισθησίας του συστήματος. Αντίθετα, οι βιοαισθητήρες τρίτης γενιάς, ως εναλλακτικά συστήματα ανίχνευσης, απαιτούσαν ελάχιστη ανθρώπινη παρέμβαση για την λειτουργία τους. Οι ερευνητές στο πεδίο αυτό, βρίσκονται συνεχώς αντιμέτωποι με την εφαρμογή και τον σχεδιασμό νέων βιοαισθητήρων, ενώ η συνεχής βελτίωση των τεχνικών λειτουργίας των βιοαισθητήρων, εξακολουθεί να βασίζεται στην εκτενή μελέτη της αναποτελεσματικότητας των προηγούμενων συστημάτων [Mehrnar - Abdi, 2004].

4.1 Ορισμός – Αρχή λειτουργίας βιοαισθητήρων

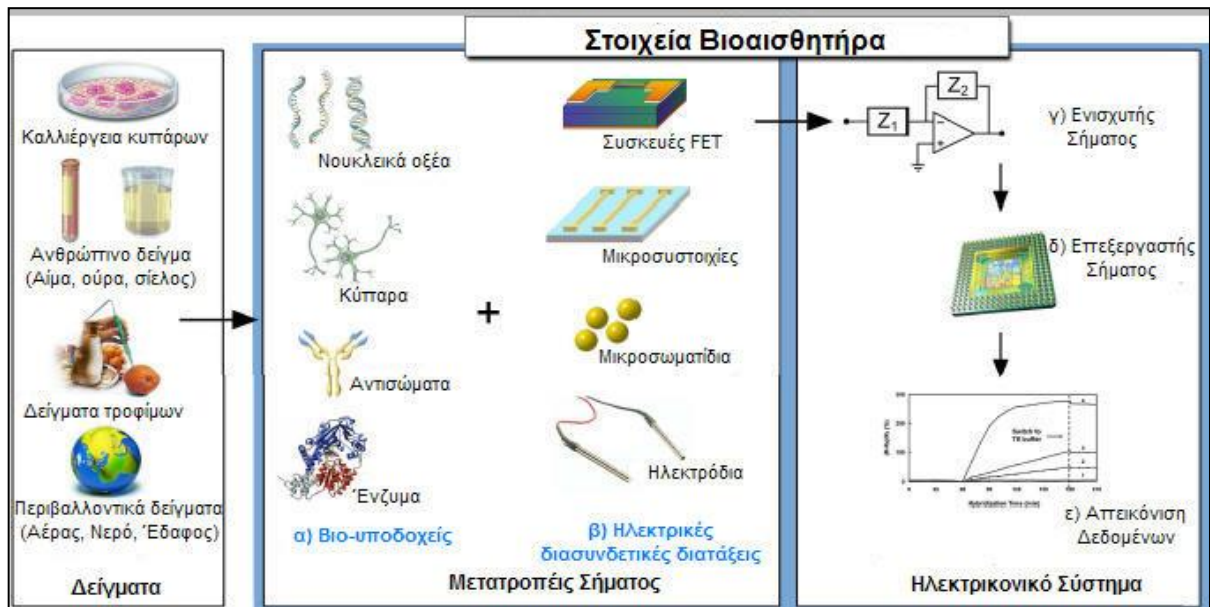
Η ραγδαία εξέλιξη του ερευνητικού πεδίου των βιοαισθητήρων, δημιούργησε σύγχυση στην ορολογία τους. Όπως χαρακτηριστικά αναφέρει ο A.Cunningham το 2002 , για μεγάλο χρονικό διάστημα υπήρχαν τόσοι ορισμοί για τον «βιοαισθητήρα», όσοι και οι ερευνητές στο πεδίο αυτό. Σε αυτή τη γενική ασάφεια συνέτεινε η πολυσυλλεκτικότητα που παρουσιάζει ο τομέας. Ένας ορισμός που μπορεί να δοθεί για τους βιοαισθητήρες είναι ότι οι βιοαισθητήρες είναι αναλυτικές συσκευές, οι οποίες ανιχνεύουν βιοχημικές και φυσιολογικές μεταβολές [Cunningham A., 2002]. Χρησιμοποιούν ως βιολογικό υλικό, κάποιο υλικό βιολογικής προέλευσης ή κάποιο βιομιμητικό υλικό, προκειμένου να ανιχνεύσουν μια συγκεκριμένη αναλυτέα ουσία σε κάποιο υπόστρωμα, ενεργοποιώντας υψηλής εξειδίκευσης αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα βιολογικά μόρια ανίχνευσης και στην προς ανάλυση ουσία. Η αναλυτέα ουσία μπορεί να είναι οποιοδήποτε συστατικό που συμμετέχει σε κάποια βιοχημική διαδικασία,

(οργανικό συστατικό, όπως πρωτεΐνες, σάκχαρα ή ανόργανο συστατικό, όπως αέρια, ιόντα, βαρέα μέταλλα) ή οποιαδήποτε μονάδα που συμμετέχει σε κάποια βιοχημική διαδικασία, (μικροοργανισμοί, κύτταρα, αντισώματα, αντιγόνα). Οι βιοαισθητήρες είναι ευαίσθητοι σε φυσικά και χημικά ερεθίσματα και μετατρέπουν μια βιολογική απόκριση σε ηλεκτρικό σήμα, μεταδίδοντας έτσι πληροφορίες για μια ζωτική διαδικασία και για μια βιοχημική ή φυσιολογική μεταβολή. Η ικανότητα των βιολογικών μορίων να αντιδρούν με συστατικά πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων, επιτρέπει στους βιοαισθητήρες να χρησιμοποιούνται σε ποικίλες εφαρμογές, όπως είναι η ανίχνευση τοξικών και ρυπαντικών ουσιών στο νερό, στον αέρα και στο έδαφος, οι ποιοτικοί έλεγχοι τροφίμων και ο εντοπισμός μορίων ιατρικής σημασίας, όπως ορμονών, σακχάρων και πεπτιδίων υγρών του σώματος. Οι βιοαισθητήρες, επίσης, μπορούν να ανιχνεύσουν την συγκέντρωση ουσιών και άλλες παραμέτρους βιολογικού ενδιαφέροντος, χωρίς άμεση χρήση βιολογικών συστημάτων, όπως συμβαίνει στη βιομηχανία τροφίμων. Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια ραγδαία αύξηση στις διαγνωστικές μεθόδους που βασίζονται σε βιοαισθητήρες που αποτελούνται από ζωντανά, άθικτα κύτταρα και σε ορισμένες περιπτώσεις ιστούς, κινητικά οργανίδια ή ακόμα και ολόκληρους οργανισμούς. Η ικανότητά των βιοαισθητήρων να μετρούν εξειδικευμένα και με μεγάλη ευαισθησία σχεδόν οποιοδήποτε χημικό δυναμικό, πιστεύεται ότι θα οδηγήσει στην αποκλειστική τους χρήση στη βιομηχανία και στην ζωή για τους πάσης φύσεως ελέγχους.



Σχήμα 1.2 Αρχή λειτουργίας βιοαισθητήρων [Mansoori et.al., 2007].

Η γενική αρχή λειτουργίας των βιοαισθητήρων, (Σχήμα 1.2), προσομοιάζει με εκείνη των κλασσικών ηλεκτροδίων μέτρησης pH ή διαφοράς δυναμικού. Ο βιοαισθητήρας μπορεί να θεωρηθεί ως το αποτέλεσμα της σύζευξης δύο κύριων τμημάτων, του βιολογικού υλικού, (bioelement), το οποίο λειτουργεί ως το ενεργό τμήμα ανίχνευσης και του μετατροπέα σήματος, (transducer), [biosensor => bio-element & sensor – element]. Το ενεργό τμήμα ανίχνευσης ενός βιοαισθητήρα, είναι κάποιο βιολογικό μόριο, (ιστός, μικροοργανισμός, κυτταρικός υποδοχέας, ένζυμο, αντίσωμα, νουκλεϊκό οξύ), κάποιο στοιχείο βιολογικής προέλευσης ή κάποιος βιομιμητικό μόριο. (Σχήμα 1.3). Το βιολογικό υλικό εμφανίζει εκλεκτικότητα για μια συγκεκριμένη αναλυτέα ουσία και έτσι είναι υπεύθυνο για την εξειδικευμένη μοριακή αναγνώριση της ουσίας αυτής και την επιλεκτικότητα της συσκευής, καθιστώντας την έτσι ένα δυναμικό εργαλείο σε περιπτώσεις όπου απαιτείται υψηλή εκλεκτικότητα. Το βιολογικό τμήμα είναι στενά συνδεδεμένο με ένα μετατροπέα σήματος, (μεταλλάκτη). Ο μετατροπέας σήματος, είναι απαραίτητος για την μετατροπή μιας συγκεκριμένης βιολογικής ή (βιο)χημικής μεταβολής, που προκύπτει κατά την διαδικασία της μοριακής αναγνώρισης της ουσίας – στόχου από το βιολογικό υλικό, σε ηλεκτρικής φύσεως πληροφορία, η οποία θα συμβάλλει στην αναγνώριση κάποιου συγκεκριμένου στοιχείου ή στην ανίχνευση και στον διαχωρισμό των διαφορετικών βιοχημικών συστατικών μιας σύνθετης ουσίας, καθώς οι διαστάσεις του παραγόμενου ηλεκτρικού σήματος αντιστοιχούν στην συγκέντρωση της αναλυτέας ουσίας. Λειτουργεί με φυσικοχημικό τρόπο και συνδυάζει την εξειδίκευση και την εκλεκτικότητα του βιολογικού τμήματος με την υπολογιστική δύναμη του μικροεπεξεργαστή. Τέλος, το ηλεκτρικό τμήμα του βιοαισθητήρα λαμβάνει το σήμα από τον μετατροπέα ενέργειας, το καταγράφει και το εκφράζει υπό μορφή μετρήσεων.



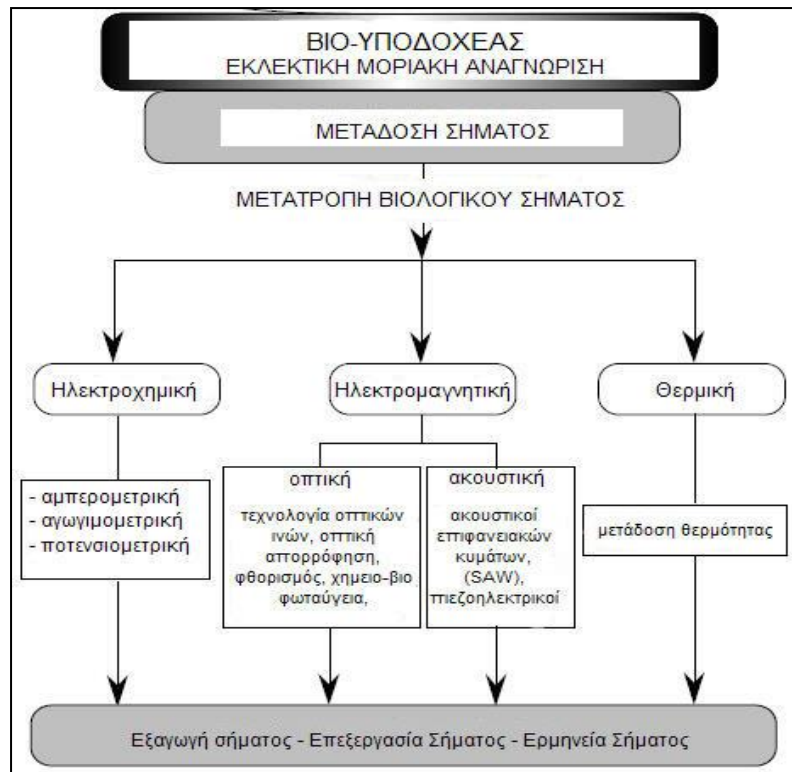
Σχήμα 1.3 Δομικά στοιχεία ενός τυπικού βιοαισθητήρα[Grieshaber D., 2008]

4.2. Ταξινόμηση βιοαισθητήρων

Με βάση το είδος του μετατροπέα σήματος:

Ένας από τους βασικούς τρόπους κατηγοριοποίησης των βιοαισθητήρων βασίζεται στην φυσικοχημική αρχή, η οποία διέπει το σύστημα ανίχνευσης - τροποποιητή σήματος, (Σχήμα 1.4). Έτσι οι βιοαισθητήρες διακρίνονται κυρίως σε:

- i) ηλεκτροχημικούς, (αγωγιμετρικούς, ποτενσιομετρικούς, αμπερομετρικούς), [Kintzios, 2009],
- ii) οπτικούς, οι οποίοι μετρούν οπτικές παραμέτρους, όπως απορρόφηση, φθορισμό, χημειοφωταύγεια, κ.α.,
- iii) βαρυμετρικούς, οι οποίοι έχουν μετρούν τις αλλαγές στην μάζα, (πιεζοηλεκτρικοί, ακουστικοί επιφανειακών κυμάτων) και
- iv) θερμομετρικούς, οι οποίοι υπολογίζουν την έκλυση και την απορρόφηση θερμότητας.



Σχήμα 1.4 Ταξινόμηση βιοαισθητήρων με βάση την αισθητήρια αρχή με την οποία ανιχνεύεται η μετρήσιμη ποσότητα [Bedioui, 1999].

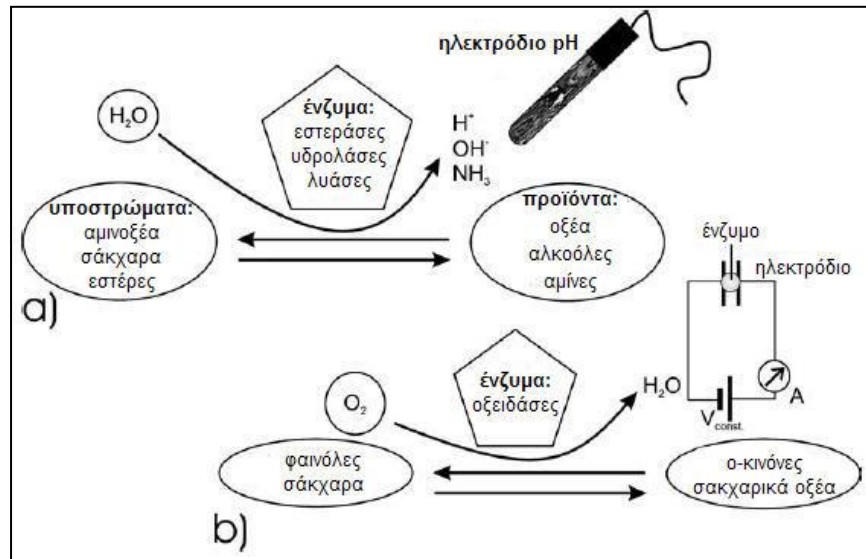
Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι βιοαισθητήρες σε κλινικές αναλύσεις και διαγνωστικές μελέτες. Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες αποτελούνται από ηλεκτροχημικούς μεταλλάκτες σήματος (π.χ. ηλεκτρόδια). Οι βιοαισθητήρες αυτοί βασίζονται σε μία ενζυμικά καταλυόμενη αντίδραση, που οδηγεί στην παραγωγή ιόντων. Οι βιοαισθητήρες που βασίζονται σε αυτή τη μέθοδο αναγνώρισης, απλοποιούν σημαντικά την μετατροπή του σήματος, χωρίς να χρειάζονται δαπανηρό εργαστηριακό εξοπλισμό. Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες εφαρμόζονται κυρίως για την ανίχνευση συγκεντρώσεων γλυκόζης, για τον εντοπισμό υβριδισμένων τμημάτων DNA κ.α. Οι ηλεκτροχημικοί μεταλλάκτες σήματος διακρίνονται σε:

- Ποτενσιομετρικούς,
- Αμπερομετρικούς και
- Αγωγιμομετρικούς

Οι ποτενσιομετρικοί βιοαισθητήρες, υπολογίζουν το οξειδωτικό/αναγωγικό δυναμικό μιας ηλεκτροχημικής αντίδρασης. Στην ποτενσιομετρία καταγράφεται το δυναμικό που διαρρέει ένα ηλεκτροχημικό στοιχείο σε συνθήκες μηδενικού ρεύματος. Αυτοί οι βιοαισθητήρες κάνουν χρήση ενζύμων ακινητοποιημένων στην επιφάνεια μιας pH-ευαίσθητης συσκευής, (Σχήμα 1.5a) [Keusgen, 2002]. Οι δύο σημαντικότεροι εκπρόσωποι των ποτενσιομετρικών αισθητήρων, είναι τα επιλεκτικά ηλεκτρόδια ιόντων (ISEs) και οι αισθητήρες επαγόμενου πεδίου (FETs). Οι ενζυμικές αντιδράσεις οδηγούν πολύ συχνά στην παραγωγή ιόντων και γι' αυτό το λόγο η χρήση ISEs ή FETs για την παρακολούθηση της βιολογικής αναγνώρισης είναι ευρέως διαδεδομένη. Ένας περιορισμός των ποτενσιομετρικών βιοαισθητήρων είναι ότι τα συστήματα αυτά είναι ευαίσθητα σε pH-ενεργά συστατικά του αναλυόμενου δείγματος και έτσι μπορούν να λειτουργήσουν σε χαμηλές συγκεντρώσεις buffer διαλυμάτων, γεγονός όμως που δεν ωφελεί την απαιτούμενη των ενζύμων που χρησιμοποιούνται.

Οι αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες, οι οποίοι είναι μια από τις πρώτες κατηγορίες ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων που χρησιμοποιήθηκαν, ελέγχουν τις διαδικασίες μεταφοράς ηλεκτρονίων ή ιόντων. Σε αυτούς τους βιοαισθητήρες ένα ένζυμο βρίσκεται ακινητοποιημένο στην επιφάνεια ενός αμπερομετρικού ηλεκτροδίου και κατά την αντίδραση του ενζύμου με το υπόστρωμα, (όπως για παράδειγμα σάκχαρο ή φαινολικό συστατικό), παράγεται ρεύμα ανάλογο της συγκέντρωσης της αναλυτέας ουσίας, (Σχήμα 1.5b). Το παραγόμενο σήμα προέρχεται από την ανταλλαγή ηλεκτρονίων μεταξύ του βιολογικού υλικού του ενεργού τμήματος ανίχνευσης του βιοαισθητήρα και του ηλεκτροδίου εργασίας. Η αλλαγή αυτή καταγράφεται, είναι ανάλογη ή αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης της αναλυτέας ουσίας και το παραγόμενο ρεύμα, ύστερα από επεξεργασία δίνει πληροφορίες σχετικά με την σύσταση του δείγματος. Ο βιοαισθητήρας γλυκόζης των Clark και Lyons βασίζεται σε αυτή την αρχή λειτουργίας. Μειονέκτημα αυτών των συστημάτων αποτελεί η ευαισθησία τους σε ενδογενή συστατικά του προς ανάλυση δείγματος, όπως επίσης και ο κίνδυνος οξείδωσης ή αναγωγής συστατικών που εμπλέκονται στην διαδικασία αναγνώρισης [Keusgen, 2002].

Οι αγωγιμετρικοί βιοαισθητήρες ανιχνεύουν την μεταβολή στον αριθμό των ιόντων, στο φορτίο τους ή στην κινητικότητά τους, που παρατηρείται κατά την βιολογική αναγνώριση. Όταν παραχθούν ηλεκτρόνια ή ιόντα κατά μια ηλεκτροχημική αντίδραση, τότε μεταβάλλεται η συνολική αγωγιμότητα ή η αντίσταση του διαλύματος. Οι μετρήσεις της αγωγιμότητας, παρουσιάζουν χαμηλή ευαισθησία.



Σχήμα 1.5 Ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες a) Ποτενσιομετρικός βιοαισθητήρας για την ανίχνευση αμινοξέων, σακχάρων και διαφόρων εστέρων, στον οποίο οι παρατηρούμενες μεταβολές στο pH είναι ανάλογες της συγκέντρωσης της αναλυτέας ουσίας. b) Αμπερομετρικός βιοαισθητήρας για την ανίχνευση φαινόλων και σακχάρων, στον οποίο το παραγόμενο ρεύμα δίνει πληροφορίες για την αναλυτέα ουσία [Keusgen, 2002].

Στους οπτικούς βιοαισθητήρες οι οποίοι είναι μαζί με τους ηλεκτροχημικούς, οι πιο ευρέως διαδεδομένοι, ανιχνεύεται αλλαγή στις οπτικές ιδιότητες είτε του βιολογικού μορίου παρουσία του αναλύτη, είτε της ίδιας της αναλυτέας ουσίας κατά την βιολογική αναγνώριση και αυτή η μεταβολή συσχετίζεται με την συγκέντρωση του αναλύτη. Βασίζονται, κυρίως, σε αλλαγές στην απορρόφηση, ή στον φθορισμό μιας κατάλληλης ένωσης, που λειτουργεί ως δείκτης.

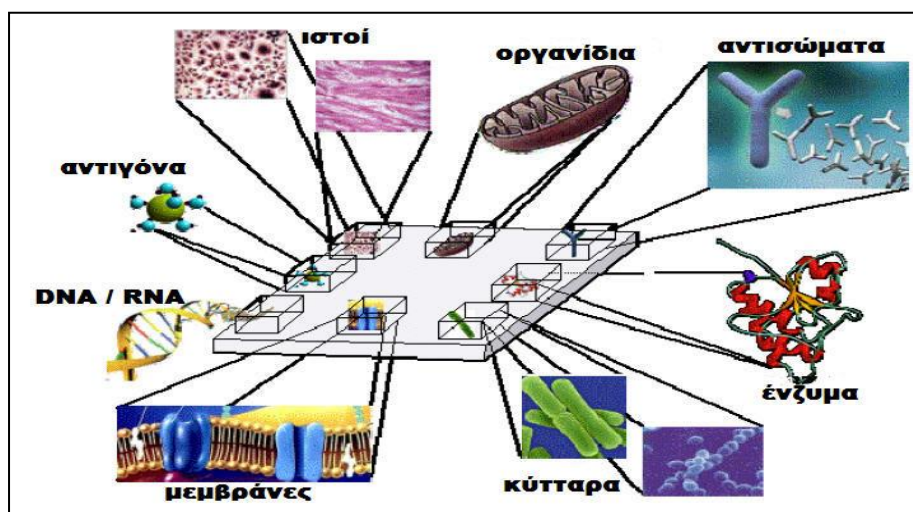
Οι βαρυμετρικοί βιοαισθητήρες, διαχωρίζονται στους πιεζοηλεκτρικούς (Piezoelectric), οι οποίοι βασίζονται στην μέτρηση της μεταβολής της χαρακτηριστικής συχνότητας συντονισμού των κρυστάλλων από τους οποίους αποτελούνται, λόγω της μεταβολής της ολικής μάζας στην επιφάνεια του κρυστάλλου και στους ακουστικούς επιφανειακών κυμάτων (Surface Acoustic Wave), στους οποίους η αλλαγή της μάζας των κρυστάλλων προκαλεί αλλαγές στην συχνότητα συντονισμού ενός εξωτερικά εφαρμοζόμενου κύματος το οποίο περνά δια μέσου της επιφάνειάς τους. Οι βιοαισθητήρες αυτοί ουσιαστικά λειτουργούν ως αισθητήρες μάζας, κάτι που οφείλεται στην γραμμική σχέση που υπάρχει ανάμεσα στην αλλαγή της μάζας (ή κάτω από κατάλληλες συνθήκες του ιξώδους) στην επιφάνεια του κρυστάλλου και στην συχνότητα ταλάντωσης της.

Οι θερμομετρικοί, (θερμικοί), βιοαισθητήρες, βασίζονται στην μέτρηση της μεταβολής της θερμοκρασίας, η οποία προκαλείται από την θερμότητα που εκλύεται ή απορροφάται κατά την βιολογική αναγνώριση της αναλυτέας ουσίας.

B. Με βάση την φύση των βιομορίων αναγνώρισης:

Οι βιοαισθητήρες κατατάσσονται ανάλογα με το είδος των βιομορίων αναγνώρισης που χρησιμοποιούν, (Σχήμα 1.6), σε:

- i) ενζυμικούς βιοαισθητήρες, όπου το ακινητοποιημένο βιολογικό σύστημα είναι ένζυμο,
- ii) ανοσοαισθητήρες, όπου το ακινητοποιημένο βιολογικό σύστημα είναι αντίσωμα ή αντιγόνο αντίστοιχα συζευγμένο με ένζυμο ή χρωστική,
- iii) DNA βιοαισθητήρες, όπου το ακινητοποιημένο βιολογικό σύστημα είναι κάποιο νουκλεϊκό οξύ,
- iv) κυτταρικούς βιοαισθητήρες / βιοαισθητήρες μικροοργανισμών, όπου το βιολογικό τμήμα μπορεί να είναι κύτταρο - ιστός - πρωτεΐνη / μικροοργανισμός και
- v) βιομιμητικούς βιοαισθητήρες, όπου το ακινητοποιημένο βιολογικό σύστημα αποτελούν τεχνητές μεμβράνες, μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή, χημικά και γενετικά τροποποιημένα μόρια. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφοροι τύποι στρωμάτων βιολογικής αναγνώρισης, ανάλογα με την φύση της αναλυτέας ουσίας, προκειμένου να επιτευχθεί η επιθυμητή επιλεκτικότητα.



Σχήμα 1.6 Τύποι βιολογικού υλικού βιοαισθητήρων.

Τα ένζυμα είναι το πιο διαδεδομένο είδος βιολογικών μορίων που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων. Πρόκειται για πρωτεΐνες αποτελούμενες από μία ή περισσότερες πολυπεπτιδικές αλυσίδες με συγκεκριμένη τρισδιάστατη διάταξη στο χώρο και δρουν καταλυτικά παρουσία κάποιων μορίων, που ονομάζονται συμπαράγοντες. Η αξιοσημείωτη επιλεκτικότητα, η μεγάλη καταλυτική δραστηριότητα καθώς και η γρήγορη κινητική των περισσότερων ενζύμων είναι τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα που εστίασαν το ενδιαφέρον των ερευνητών στη χρήση ενζύμων στους βιοαισθητήρες. Από τα μειονεκτήματα ξεχωρίζουν το μεγάλο κόστος και η αστάθεια των περισσότερων ενζύμων.

Τα αντισώματα εμφανίζουν μεγάλη επιλεκτικότητα, εξαιρετική ευαισθησία, απουσία καταλυτικής δράσης και δημιουργία ισχυρών δεσμών. Η πολύ ισχυρή δέσμευση των αντισωμάτων με τα αντιγόνα, οδηγεί σε αλληλεπιδράσεις μη αντιστρεπτές, με αποτέλεσμα οι αντίστοιχοι βιοαισθητήρες να είναι συνήθως μίας χρήσης. Πιο διαδεδομένη τεχνική είναι η επισήμανση των αντιγόνων με ένζυμα.

Τα νουκλεϊκά οξέα παρουσιάζουν παρόμοια δράση με εκείνη των αντισωμάτων. Οι DNA καθετήρες, (DNA probes), είναι μια κατηγορία αισθητήρων, οι οποίοι αναπτύσσονται βάσει των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των βάσεων μίας αλληλουχίας νουκλεϊνικών οξέων και μορίων DNA και χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση γενετικών ασθενειών και μολύνσεις από ιούς. Οι DNA βιοαισθητήρες δομής βασίζονται στην ακινητοποίηση διαφόρων μορφών DNA στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια. Η ακινητοποίηση αυτή έχει ως σκοπό το χαρακτηρισμό διαφόρων ενώσεων για πιθανή αντικαρκινική, ή τοξική δράση τους. Στους βιοαισθητήρες αυτούς μελετώνται φαινόμενα, όπως είναι η μεταβολή στο ηλεκτροχημικό σήμα των βάσεων του DNA. Η δέσμευση με το DNA έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της σύνθεσης των νουκλεϊνικών οξέων.

Τα κύτταρα, οι ιστοί και οι μικροοργανισμοί, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή βιοαισθητήρων και χαρακτηρίζονται από το σημαντικό πλεονέκτημα ότι δεν χρειάζεται να γίνει απομόνωση και καθαρισμός ενζύμων. Οι βιοαισθητήρες μικροοργανισμών βασίζονται στη χρήση μικροοργανισμών ως βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης. Χρησιμοποιούνται κυρίως τρεις μηχανισμοί. Για τον πρώτο μηχανισμό, ο ρύπος λειτουργεί ως υπόστρωμα κατά την αναπνοή των μικροοργανισμών. Ο δεύτερος μηχανισμός περιλαμβάνει την παρεμπόδιση της αναπνευστικής διαδικασίας των μικροοργανισμών από την προς ανάλυση ένωση. Τέλος, ο τρίτος μηχανισμός, σχετίζεται με την χρήση γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών

(genetically engineered microorganisms-GEMs) οι οποίοι αναγνωρίζουν και ανιχνεύουν την παρουσία συγκεκριμένων ρύπων.

Γ. Με βάση τον τρόπο δράσης του βιομορίου αναγνώρισης:

Οι βιοαισθητήρες μπορούν να ταξινομηθούν βάσει του τρόπου δράσης του βιομορίου αναγνώρισης σε:

- i) βιοκαταλυτικούς βιοαισθητήρες, στους οποίους ο υποδοχέας μπορεί να είναι ένζυμο, κύτταρο ή ιστός και
- ii) βιοαισθητήρες συγγένειας, όπου ο υποδοχέας μπορεί να είναι DNA, RNA, ή αντίσωμα.

Οι βιοκαταλυτικοί βιοαισθητήρες βασίζονται σε μία αντίδραση που καταλύεται από μακρομόρια, τα οποία είτε είναι παρόντα στον αρχικό βιολογικό περιβάλλον, είτε έχουν απομονωθεί, ή παραχθεί προηγουμένως με κατάλληλο τρόπο. Βασίζονται κυρίως στην ακινητοποίηση ενζύμων πάνω σε μία ηλεκτροδιακή επιφάνεια, τα οποία είναι εκλεκτικά σε συγκεκριμένες ενώσεις, που αποτελούν υποστρώματά τους. Τρία είδη βιοκαταλυτών μπορούν να χρησιμοποιηθούν:

- Ένζυμα (μόνο- ή πολυ- ένζυμα). Τα ένζυμα που συχνά ακινητοποιούνται είναι οι οξειδάσες και τελικά ανιχνεύεται το παραγόμενο υπεροξειδίο του υδρογόνου. Μπορούν όμως να ακινητοποιηθούν και δεϋδρογονάσες, οπότε τελικώς ανιχνεύεται το NADH.
- Ολόκληρα κύτταρα (μικροοργανισμοί, όπως βακτήρια, μύκητες, ευκαρυωτικά κύτταρα, ζυμομύκητες) ή οργανίδια των κυττάρων, ή συστατικά των κυττάρων (μιτοχόνδρια, κυτταρικά τοιχώματα).
- Ιστοί (φυτικοί ή ζωικοί).

Οι βιοαισθητήρες συγγένειας, βασίζονται στην αλληλεπίδραση της προς ανάλυση ένωσης με μακρομόρια ή οργανωμένα συγκροτήματα μορίων, τα οποία είτε έχουν απομονωθεί από το βιολογικό τους περιβάλλον, είτε έχουν τροποποιηθεί προηγουμένως με κατάλληλο τρόπο. Κάποια χρονική στιγμή επέρχεται ισορροπία, δημιουργείται ένα σύμπλοκο και συνεπώς δεν παρατηρείται κατανάλωση της προς ανάλυση ένωσης από τον ακινητοποιημένο βιολογικό παράγοντα. Η αλληλεπίδραση που πραγματοποιείται, μπορεί να είναι αλληλεπίδραση αντισώματος-αντιγόνου ή αλληλεπίδραση δέκτη-ανταγωνιστή.

Οι βιοαισθητήρες αποτελούν ένα πολλά υποσχόμενο πεδίο στην επιστήμη των αισθητήρων καθώς:

- Τα στοιχεία τους παρουσιάζουν εκλεκτικότητα σε βιολογικά ενεργές ουσίες.
- Χαρακτηρίζονται από την ικανότητα να αντιδρούν σε κάποιο ερέθισμα που προκαλεί η αναλυτέα ουσία με φυσιολογικό τρόπο.
- Διακρίνονται από υψηλή ευαισθησία και καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών.
- Δύνανται να παρέχουν λύσεις σε θέματα ελέγχου της συγκέντρωσης μιας αναλυτέας ουσίας, βασιζόμενοι σε μια ταχεία, ευαίσθητη, χαμηλού κόστους τεχνολογία.

Παρ' όλα αυτά, έχουν και ορισμένους περιορισμούς, όπως είναι οι ηλεκτροχημικά ενεργές επιφάνειες των αναλυτέων ουσιών και η βραχυχρόνια σταθερότητά τους, καθώς όντας συστήματα που χρησιμοποιούν απομονωμένα βιολογικά συστατικά, αντιμετωπίζουν προβλήματα που αφορούν την σταθερότητα και τον χρόνο ζωής των βιολογικών αυτών συστατικών. Επίσης, υπάρχει η πιθανότητα να παρατηρηθούν σημαντικές αποκλίσεις στις αποκρίσεις των βιοαισθητήρων που χρησιμοποιούν κύτταρα ή οργανισμούς από διαφορετικές σειρές, κάτι που υποδεικνύει την ανάγκη για συνεχή και προσεκτικό έλεγχο των συνθηκών ανάπτυξης των διαφορετικών σειρών βιολογικού υλικού που χρησιμοποιείται, προκειμένου να απαλειφθούν τυχόν διαφοροποιήσεις μεταξύ τους. Η ηλικία, η θερμοκρασία, ο πληθυσμός και ο αερισμός μιας καλλιέργειας, είναι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την απόκριση ενός βιοαισθητήρα [Ramakrishna et. al.,2005].

5. Κυτταρικοί Βιοαισθητήρες

Οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες είναι εργαλεία ανάλυσης. Ένας βιοαισθητήρας είναι μια αναλυτική συσκευή που μετατρέπει μια βιολογική διαδικασία σε ένα (συνήθως) ηλεκτρικό ή οπτικό σήμα. Ο όρος «βιοαισθητήρας» περιλαμβάνει και συσκευές, που χρησιμοποιούνται προκειμένου να προσδιορίσουν τη συγκέντρωση χημικών ουσιών, αλλά και «στοιχεία» βιολογικού περιεχομένου, οι οποίες δεν χρησιμοποιούν απαραίτητα ή δεν περιλαμβάνουν κάποιο βιολογικό τμήμα. Κύτταρα συνδέονται με ένα μετατροπέα σήματος και στη συνέχεια μέσω κάποιων μηχανισμών του ίδιου του κυττάρου, προκαλείται η παραγωγή ενός σήματος, συνήθως

ηλεκτρικού, το οποίο μέσω του μετατροπέα μετατρέπεται σε ψηφιακό σήμα και με το κατάλληλο λογισμικό λαμβάνεται η μέτρηση.

Μια άλλη προσέγγιση θα ήταν να χαρακτηρίσουμε τους βιοαισθητήρες ως συσκευές, οι οποίες χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση μιας χημικής ένωσης και οι οποίες αποτελούνται ή συνδυάζουν ένα βιολογικό τμήμα με ένα φυσικοχημικό ανιχνευτή [Nagel et al., 1992]. Ο κυτταρικός βιοαισθητήρας περιλαμβάνει τρία βασικά τμήματα:

1. Το βιολογικό τμήμα όπως κύτταρα ή οργανίδια κυττάρων, ένζυμα, αντισώματα κλπ
2. Τον μετατροπέα, ο οποίος όπως προαναφέρθηκε μετατρέπει το σήμα που παράγεται από την αντίδραση του βιολογικού τμήματος με το προς ανάλυση «συστατικό», σε ένα είδος σήματος που εύκολα μπορεί να αναγνωστεί, να μετρηθεί και κατά συνέπεια από αυτό να αντληθούν τα ανάλογα συμπεράσματα, συνήθως με τη βοήθεια κάποιου λογισμικού.
3. Το υπολογιστικό σύστημα με το εγκατεστημένο σε αυτό λογισμικό αποτελούν το τρίτο τμήμα του βιοαισθητήρα [Perdikaris et al., 2009].

5.1 Τύποι κυτταρικών βιοαισθητήρων

Ουσιαστικά το τμήμα του βιοαισθητήρα που τον διαφοροποιεί σε κατηγορίες ή τύπους είναι το βιολογικό τμήμα, λαμβάνοντας υπόψη ότι διάφορα είδη κυττάρων μπορούν να χρησιμοποιηθούν, όπως φυτικά ή ζωικά κύτταρα, ζύμες, βακτηριακά κύτταρα ακόμα και μύκητες ή καρποφορίες μυκήτων ή ακόμα και ολόκληροι ιστοί και όργανα [Macholán et al., 1984].

Σε ορισμένες περιπτώσεις υπάρχει η δυνατότητα χρήσης διαφορετικών ειδών κυττάρων στον ίδιο αισθητήρα, όπου η αντίδραση του ενός είδους είναι συμπληρωματική ή ενισχυτική ως προς την αντίδραση του άλλου [Karube et al., 1981; Racek et al., 1990]. Γενικά τα είδη των κυτταρικών βιοαισθητήρων είναι δύο (2):

1. Οι **μικροβιακοί βιοαισθητήρες**, στους οποίους χρησιμοποιείται κυρίως ικανός αριθμός ζυμών ή βακτηρίων με κύριο χαρακτηριστικό την παραγωγή ενός ενζύμου. Απαραίτητο στοιχείο για την έναρξη παραγωγής του ενζύμου είναι η ύπαρξη και του κατάλληλου υποστρώματος. Τα μικροβιακά κύτταρα ακινητοποιούνται στην επιφάνεια ενός ευαίσθητου ηλεκτρόδιου. Η ευαισθησία των εν λόγω κυττάρων αυξάνεται με την «βελτίωση» της περατότητας της μεμβράνης τους με διάφορα μέσα όπως το dimethylsulfoxide (DMSO).

2. Οι **αισθητήρες κυτταρικών ιστών ή μεμονωμένων κυττάρων προερχόμενοι από ζώα ή φυτά**. Θεωρητικά ακόμη και ένα κύτταρο μπορεί να παράγει ένα μετρήσιμο ηλεκτρικό σήμα. Τα κύτταρα είτε μικροβιακά είτε κύτταρα προερχόμενα από φυτικούς ή ζωικούς ιστούς ακινητοποιούνται σε διάφορα υλικά, τα οποία δημιουργούν ένα ευνοϊκό περιβάλλον. Μερικά παραδείγματα τέτοιων υλικών είναι τα πήγματα άγαρ [Matsunaga et al., 1978; Odata et al., 1993], πολυακρυλαμίδης (Wollenberger et al., 1980) και αλγινικού ασβεστίου [Kitagawa et al., 1987; Racek, J., 1991]. Το τελευταίο έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως λόγω της «φιλικότητας» του κυτταρικού περιβάλλοντος που δημιουργεί και εντός του οποίου βρίσκονται εγκλωβισμένα τα κύτταρα του βιοαισθητήρα. [Kintzios S.,2007; Perdikaris et al.,2011]

6. Μέθοδος Βιοηλεκτρικής Αναγνώρισης (Bioelectric Recognition Assay – BERA)

Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου BERA περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1999 και οι πρώτες εφαρμογές της δημοσιεύτηκαν το 2001. Αυτές αφορούσαν την ανίχνευση φυτικών και ηπατικών ιών αλλά και χημικών ενώσεων (glyphosate), οι οποίες χρησιμοποιούνται στη γεωργία (Kintzios et. al., 2001a; 2001b).

Η λειτουργία της μεθόδου βασίζεται στην ανταπόκριση του κυττάρου όταν αυτό έρθει σε επαφή με διάφορες χημικές ενώσεις ή μόρια (ιοί), η οποία εκφράζεται με μεταβολή του ηλεκτρικού δυναμικού της μεμβράνης.

Η διαμόρφωση του βιοαισθητήρα κατά την ανίχνευση ηπατικών ιών περιελάμβανε ένα βιολογικό τμήμα το οποίο αποτελούνταν από μια σειρά ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων καθώς και ηπατικών κυττάρων, τα οποία εμφανίζουν συγκεκριμένη αντίδραση στην παρουσία ηπατικών ιών και συγκεκριμένα του ιού C της ηπατίτιδας (Hepatitis virus C, HCV).

Η ακινητοποίηση των κυττάρων έλαβε χώρα σε αгарόζη χαμηλού σημείου τήξης. Αντίστοιχα για την ανίχνευση φυτικών ιών χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα καπνού των οποίων η αντίδραση, σύμφωνα με την περιγραφή των αποτελεσμάτων της μεθόδου ήταν διαφοροποιημένη ανάλογα με το είδος του ιού. Όπως θα δούμε και στα επόμενα κεφάλαια που σχετίζονται με το ερευνητικό τμήμα της παρούσης διατριβής, τα εν λόγω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με μια σειρά εργασιών. Αναφορικά με την ανταπόκριση του βιοαισθητήρα σε συγκεκριμένες χημικές ενώσεις, η αντίδραση του βιοαισθητήρα BERA ήταν διαφοροποιημένη.

Οι διαμορφώσεις του βιοαισθητήρα κατά την πρώτη παρουσίαση του ήταν δύο:

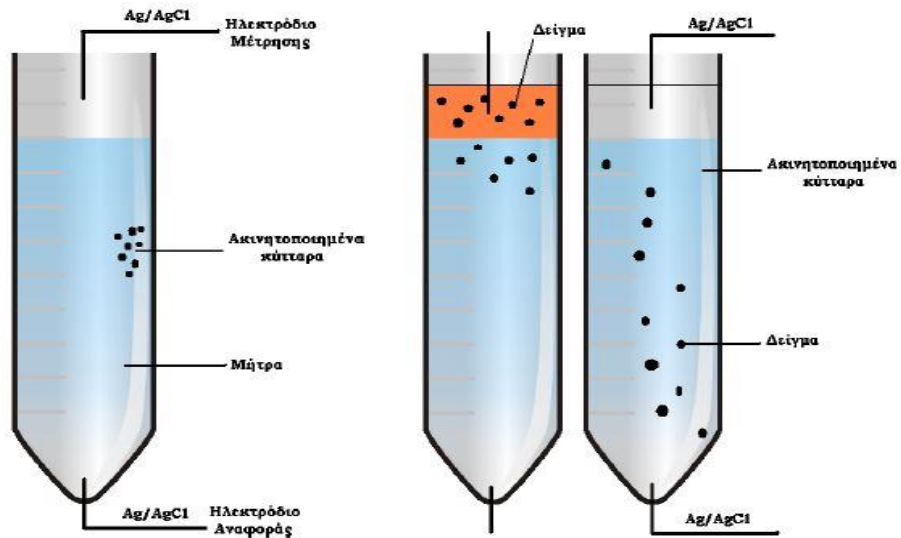
Διαμόρφωση Α

Το ηλεκτρόδιο μέτρησης τοποθετήθηκε στην περιοχή εφαρμογής του δείγματος και το ηλεκτρόδιο αναφοράς στην αντίθετη πλευρά της μήτρας ακινητοποίησης (Σχήμα 1.7α). Στο εν λόγω μοντέλο κατά την εφαρμογή του δείγματος και στη συνέχεια αντίδραση του με τα ακινητοποιημένα κύτταρα του αισθητήρα, προκαλείται αλλαγή του δυναμικού στην περιοχή όπου βρίσκεται το ηλεκτρόδιο μέτρησης. Αντίστοιχα, στην περιοχή όπου βρίσκεται το ηλεκτρόδιο αναφοράς το δυναμικό διατηρεί την αρχική του τιμή (λόγω μη επαφής του δείγματος με τα κύτταρα). Κατά αυτό τον τρόπο δημιουργείται μια διαφορά δυναμικού μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων. Επειδή το δείγμα θα συνεχίσει να κινείται μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων και να αντιδρά με τα κύτταρα του αισθητήρα, σταδιακά θα προκληθεί μείωση της διαφοράς δυναμικού, έως ότου θεωρητικά μηδενιστεί. Στην πράξη θα σταθεροποιηθεί σε μια συγκεκριμένη τιμή.

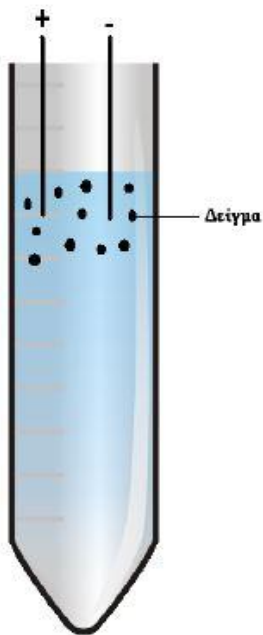
Διαμόρφωση Β

Κατά τη 2η διαμόρφωση και τα δύο ηλεκτρόδια βυθίζονται στη μήτρα, οπότε ο βιοαισθητήρας συμπεριφέρεται σαν ένα γαλβανικό ζεύγος (Σχήμα 1.7β). Κατά την εφαρμογή του δείγματος διασκορπίζεται αυτό μέσα στη μήτρα, η οποία δεν είναι απόλυτα αγωγίμη έτσι ώστε να αποφευχθεί βραχυκύκλωση του συστήματος. Κατά την εν λόγω διαμόρφωση υπάρχει δυνατότητα συσχέτισμού της προκαλούμενης διαφοράς δυναμικού και της συγκέντρωσης του δείγματος. Συνεπώς πέραν της ποιοτικής ανάλυσης υπάρχει η δυνατότητα και του ποσοτικού προσδιορισμού του δείγματος.

Ο ανωτέρω τύπος βιοαισθητήρων αφορά βιοαισθητήρες BERA πρώτης γενιάς. Από την πρώτη παρουσίαση το 2001 νέοι πιο βελτιωμένοι αισθητήρες χρησιμοποιήθηκαν σε διάφορες εφαρμογές. Όπως θα διαφανεί έχουν επέλθει σημαντικές βελτιώσεις σε τομείς όπως η επιλογή των υλικών, προετοιμασία των κυττάρων του βιοαισθητήρα, μέγεθος, κόστος κατασκευής, αλλά και σε σχέση με την ανάλυση των αποτελεσμάτων.



Σχήμα 1.7 (α) Απεικόνιση της διαμόρφωσης “Α” των βιοαισθητήρων BERA πρώτης γενιάς. Διακρίνονται τα δύο ηλεκτρόδια μέτρησης και αναφοράς, καθώς και το πήγμα με τα κύτταρα του βιοαισθητήρα (α). Η εφαρμογή του δείγματος λαμβάνει χώρα στο ανώτερο τμήμα του πήγματος (b). Κίνηση του δείγματος δια μέσω του πήγματος στο οποίο βρίσκονται ακινητοποιημένα τα κύτταρα του βιοαισθητήρα (C).



Σχήμα 1.7 (β)

Απεικόνιση της διαμόρφωσης “B” των βιοαισθητήρων BERA πρώτης γενιάς. Τα ηλεκτρόδια μέτρησης και αναφοράς στην εν λόγω διαμόρφωση βρίσκονται βυθισμένα και τα δύο στο δείγμα.

Στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκε μια παραλλαγή της βιοαισθητηριακής μεθόδου BERA για την ανίχνευση των φυτοφαρμάκων, τα οποία προκύπτουν σε υπολειμματικές δόσεις στα περισσότερα εδώδιμα λαχανικά και με τον τρόπο αυτό και στο διαιτολόγιο των καταναλωτών, για εκτίμηση κινδύνου.

[Nasreddine και Massin, 2002; Kintzios S., 2014]

Επίσης, μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την ανάπτυξη βιοαισθητήρα που βασίζεται σε κύτταρα θηλαστικών για εφαρμογές ασφάλειας των τροφίμων και τον έλεγχο ποιότητας. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στις εμπορικά διαθέσιμες μεθόδους και προϊόντα (καθώς και η αξιολόγηση της αγοράς τους μέχρι τώρα). Η πλειοψηφία των εμπορικώς διαθέσιμων λειτουργικών βιοαισθητήρων που βασίζονται σε κύτταρα και διατίθενται για την ασφάλεια των τροφίμων, χρησιμοποιούν ανώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα, σε αντίθεση με προκαρυωτικά κύτταρα. Τα σημαντικά πλεονεκτήματα, αλλά και ορισμένες αδυναμίες της προσέγγισης με κύτταρα θηλαστικών αξιολογούνται σε σχέση με άλλα συστήματα βιοαισθητήρα που βασίζονται σε κύτταρα. Ακόμα, υπάρχουν μελέτες που περιγράφουν τις προοπτικές της μεθόδου καθώς και τις συνεργιστικές επιδράσεις μεταξύ των διαφόρων ρύπων και εκτελούν εκτίμηση βιολογικών κινδύνων σε διάφορα επίπεδα και κατά πολλών οργάνων και πολλών ειδών στοιχεία . [Kintzios S., 2014]

7. Μεμβρανική Μηχανική και Τεχνική της Ηλεκτρόporωσης

Πρόσφατα εμφανίστηκε μία νέα τεχνολογία, αυτή των μιμητικών κυττάρων (γνωστών και ως κυττάρων με τροποποιημένες μεμβράνες - "membrane-engineered cells"). Τα μιμητικά κύτταρα είναι κύτταρα των οποίων η επιφάνεια έχει τροποποιηθεί με την τεχνητή εισαγωγή μορίων κατά τέτοιο τρόπο ώστε να αντιδρούν εκλεκτικά με τις ουσίες υπό ανίχνευση. Η εισαγωγή των μορίων μπορεί να γίνει με καθιερωμένες μεθόδους, όπως ηλεκτροεισαγωγή. Η προσέγγιση αυτή πλεονεκτεί της χρήσης μεθόδων γενετικής τροποποίησης, καθώς:

- Ανεξάρτητα του είδους της κάθε εφαρμογής, είναι δυνατή η εξεύρεση ή η δημιουργία (μέσω καταλλήλων μεθόδων χημικής σύνθεσης) μορίων-υποδοχέων με ικανότητα εξειδικευμένης αλληλεπίδρασης με διαφορετικούς χημικούς ή βιολογικούς παράγοντες, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται η απαιτούμενη εκλεκτικότητα. Τα μόρια-υποδοχείς μπορεί να είναι πρωτεΐνες (όπως ένζυμα, αντιγόνα ή αντισώματα), νουκλεϊκά οξέα, υδατάνθρακες, λιπίδια ή να ανήκουν σε οποιαδήποτε άλλη χημική ομάδα.
- Δεν υφίσταται, κατά βάση, κανένας περιορισμός στην εισαγωγή των μορίων-υποδοχέων στις μεμβράνες των κυττάρων. Αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί σε κυτταρικό υλικό προερχόμενο είτε από φυσική πηγή, είτε μετά από καλλιέργεια *in vitro*, είτε από τεχνητούς φορείς (όπως λιποσώματα).
- Υπάρχει η δυνατότητα εισαγωγής των μορίων-υποδοχέων σε σημαντικά μεγαλύτερη πυκνότητα ανά μονάδα κυτταρικής επιφάνειας, από ότι σε αντίστοιχη συγκέντρωση των μορίων αυτών σε διάλυμα ή σε κάποιο φορέα ακινητοποίησης (π. χ. μία συνθετική μεμβράνη). Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η ενίσχυση της αλληλεπίδρασης με μία συγκεκριμένη ουσία.
- Περισσότερα του ενός είδη μορίων-υποδοχέων μπορούν να εισαχθούν στη μεμβράνη του ίδιου κυττάρου, προσφέροντας τη δυνατότητα πραγματοποίησης συνδυασμένων αντιδράσεων αλληλεπίδρασης με τα συστατικά ενός δείγματος.

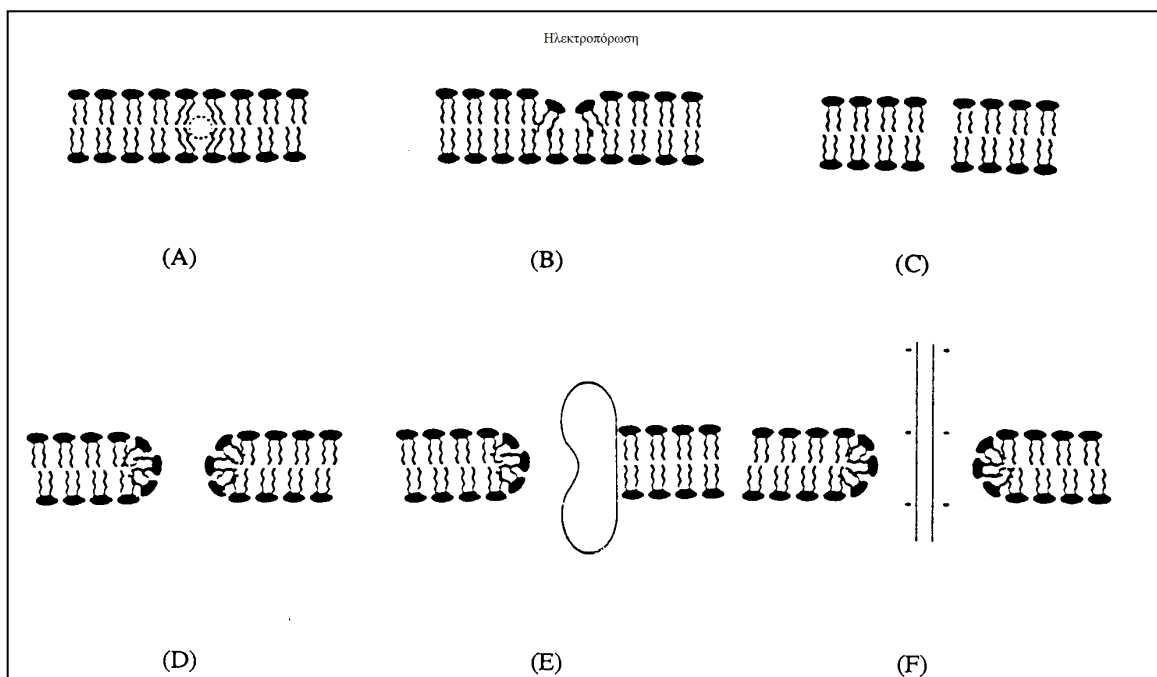
Η μεμβρανική μηχανική είναι μια γενική μεθοδολογία που εφαρμόζεται για την αύξηση της επιλεκτικότητας των κυττάρων που χρησιμοποιούνται ως βιοαισθητήρες κατά ένα μόριο-στόχο, με ηλεκτροεισαγωγή μορίων υποδοχέων στην κυτταρική επιφάνεια. Προηγούμενες μελέτες έχουν διασαφηνίσει τη βιοχημική πλευρά των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των

διαφόρων αναλυτών (συμπεριλαμβανομένων των ιών) και των ομολόγων τους στα μεμβρανικά μηχανικά κύτταρα. Έχει αποδειχθεί, με τη βοήθεια της μικροσκοπίας φθορισμού, ότι τα κύτταρα αυτά ενσωματώνουν τα ειδικά αντισώματα με σωστό προσανατολισμό και ότι τα ένθετα αντισώματα αλληλεπιδρούν επιλεκτικά με τα ομόλογα μόρια στόχους. Αυτή είναι η πρώτη φορά απεικόνιση του τρόπου λειτουργίας της μεμβρανικής μηχανικής, παρέχοντας μια τελική απόδειξη της έννοιας πίσω από αυτή την καινοτόμο διαδικασία. [Kokla et al., 2013]

Η ηλεκτροπόρωση (electroporation), ή ορθότερα ηλεκτροπερατότητα (electropermeabilization) είναι το φαινόμενο κατά το οποίο η μεμβράνη ενός κυττάρου που εκτίθεται σε παλμούς ηλεκτρικού πεδίου υψηλής έντασης, μπορεί παροδικά να αποσταθεροποιηθεί σε συγκεκριμένες περιοχές της (Σχήμα 1.9). Κατά τη διάρκεια αυτής της αποσταθεροποίησης, η κυτταρική μεμβράνη καθίσταται υψηλά διαπερατή σε εξωκυττάρια μόρια που βρίσκονται στο περιβάλλον μέσο. Με αυτή την έννοια, η ηλεκτροπόρωση μπορεί να θεωρηθεί ως μια τεχνική μαζικής μικροέγχυσης, η οποία είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί για να εισαχθούν στο εσωτερικό είτε ενός μεμονωμένου κυττάρου είτε εκατομμυρίων κυττάρων ταυτόχρονα, συγκεκριμένα συστατικά του εξωκυττάριου περιβάλλοντος. (Χαρίτου Μ., 1999)

Η ηλεκτροπόρωση είναι μία από τις κυριότερες μεθόδους εισαγωγής DNA κατά την διαδικασία μετασχηματισμού βακτηρίων, αλλά βρίσκει άριστη εφαρμογή σε περιπτώσεις στις οποίες επιθυμούμε να ακινητοποιήσουμε μακρομόρια στις μεμβράνες των βακτηρίων, ώστε να τα χρησιμοποιήσουμε αναλόγως. Συγκεκριμένα, η εφαρμογή ενός εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου μπορεί να προκαλέσει τη δημιουργία ενός υψηλού μεμβρανικού δυναμικού στους δύο πόλους του κυττάρου. Ταυτόχρονα, ένα ηλεκτρικό πεδίο μεγάλης έντασης, μπορεί να προκαλέσει λύση του κυττάρου. Ειδικότερα, όταν το επαγόμενο μεμβρανικό δυναμικό φτάσει μια κρίσιμη τιμή (κοντά 1V), μπορεί να προκαλέσει διηλεκτρική κατάρρευση της μεμβράνης. Ακόμα, γνωρίζουμε ότι ο σχηματισμός "μεμβρανικών πόρων" ή της μεμβρανικής αποσταθεροποίησης έχει ως αποτέλεσμα τη διηλεκτρική κατάρρευση της κυτταρικής μεμβράνης.

Αν το πεδίο εφαρμόζεται με τη μορφή παλμού πολύ μικρής διάρκειας, της τάξεως των 200-400 mV, τα κύτταρα είναι δυνατό να ανανήψουν από την ηλεκτρική κατεργασία, καθιστώντας την μεμβράνη διαπερατή σε μόρια και μακρομόρια. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι οι ηλεκτρικά επαγόμενοι μεμβρανικοί "πόροι" είναι δυνατό να ξανακλείσουν και μπορούν, άρα, να δημιουργηθούν χωρίς να προκαλέσουν μόνιμη βλάβη στο κύτταρο. (Chassy et al., 1988)

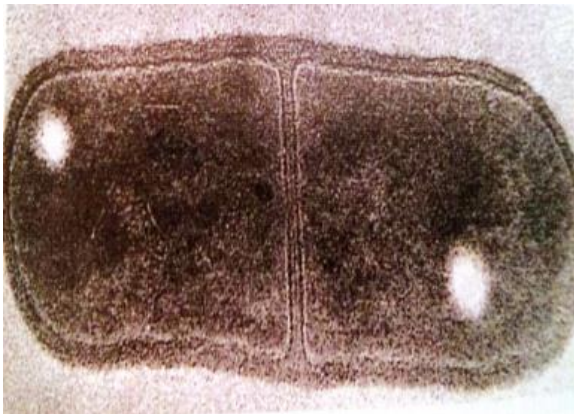


Σχήμα 1.8 Στάδια ηλεκτροπόρωσης (<http://www.cicbs.com/rife/Electroporation97.html>)

8. Βακτήρια *Lactobacillus brevis*

Οι γαλακτοβάκιλλοι είναι τυπικά ραβδόμορφα βακτήρια, που ποικίλλουν από επιμήκη λεπτά έως βραχέα κεκαμμένα. Τα περισσότερα είδη είναι ομοζυμωτικά, μερικά είναι όμως ετεροζυμωτικά. Οι γαλακτοβάκιλλοι είναι συνήθεις σε γαλακτοκομικά προϊόντα, και ορισμένα στελέχη χρησιμοποιούνται στην Παρασκευή γαλακτοκομικών με ζύμωση. Για παράδειγμα, το *Lactobacillus delbrueckii* χρησιμοποιείται στην παρασκευή γιαουρτιού, το *L.*

acidophilus στην παρασκευή ξινόγαλο, ενώ άλλα είδη χρησιμοποιούνται στην παρασκευή τουρσιών και ενσιρωμένων ζωοτροφών. Οι γαλακτοβάκιλλοι είναι συνήθως ανθεκτικότεροι σε όξινα περιβάλλοντα από τα άλλα οξυγαλακτικά βακτήρια, ικανοί να αναπτύσσονται σε τιμές pH έως και 4. Εξαιτίας αυτής της ικανότητας μπορούν να απομονωθούν επιλεκτικά από φυσικές ύλες με τη χρήση όξινου θρεπτικού μέσου πλούσιου σε υδατάνθρακες, όπως είναι το άγαρ χυμού τομάτας και πεπτόνης. Η αντοχή των γαλακτοβακίλλων στα οξέα, τους καθιστά ικανούς να εξακολουθούν να αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια φυσικών οξυγαλακτικών ζυμώσεων, όταν η τιμή του pH έχει μειωθεί σε επίπεδα πολύ χαμηλά για άλλα οξυγαλακτικά βακτήρια. Κατά συνέπεια οι γαλακτοβάκιλλοι είναι υπεύθυνοι για την ολοκλήρωση των ταλικών σταδίων των περισσότερων από τις οξυγαλακτικές ζυμώσεις. Οι γαλακτοβάκιλλοι είναι πολύ σπάνια, έως καθόλου, παθογόνοι. [Madigan M. et al., 2005, Brock 2005]



Εικόνα 1. Μικρογράφημα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης: Τα κύτταρα έχουν μέγεθος 0,8 x 0,2 μm περίπου (Otto Kandler, Brock, Τόμος I, p.467)



Εικόνα 2. Lactobacillus brevis, Jeff Broadbent, Utah State University [JGI Microbes. Url: http://genome.jgi-](http://genome.jgi-jgi-microbes.org)

Τα βακτήρια του είδους αυτού είναι ετεροζυμωτικά βακτήρια που μεταβολίζουν εξόζες μέσω του βιοχημικού μονοπατιού του 6-φωσφογλυκονικού. Τα προϊόντα του μεταβολισμού αυτού είναι γαλακτικό οξύ, διοξειδίο του άνθρακα και αιθανόλη και/ή οξικό οξύ. (Kandler, 1983). Μπορούν να απομονωθούν από πολλά διαφορετικά περιβάλλοντα και συνήθως χρησιμοποιούνται ως εναρκτήρια καλλιέργεια σε ζύμωση ενσιρώματος καθώς και σε μερικά είδη μπύρας. Σε ροφήματα που συλλέγονται έπειτα από αλκοολική ζύμωση, οι λακτοβάκιλλοι μπορούν να προσδώσουν θετικά στην γεύση ή και να την αλλοιώσουν. Συγκεκριμένα στελέχη του *Lactobacillus brevis* είναι ανθεκτικά σε πικρές ουσίες του λυκίσκου όπως την ισοχουμουλόνη και μπορούν να αναπτυχθούν στην μπύρα. Η ανάπτυξη τους αλλάζει την θολότητα, τη γεύση και το άρωμα. (Richards and Macrae, 1964). Τα στελέχη του *L. brevis* που σχετίζονται με την ζύμωση του κρασιού μπορεί να παράγουν βιογενείς αμίνες από την αποκαρβοξυλίωση των πρόδρομων αμινοξέων μέσω της δράσης ειδικών ενζύμων. Η κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν υψηλά επίπεδα τέτοιων αμινών, όπως η ισταμίνη και η τυραμίνη, μπορεί να οδηγήσει σε διάφορες τοξικολογικές διαταραχές. (Brink et al., 1990; Mariné-Font et al., 1995).

Ακόμα τα βακτήρια του είδους αυτού εμφανίζουν συγκριτικό πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλα διαφορετικού γένους.

Συγκεκριμένα:

-Τα σφαιρικά κύτταρα με μικρότερη διάμετρο απαιτούν ισχυρότερα πεδία ηλεκτροπόρωσης σε σχέση με τα κύτταρα σε σχήμα κόκκου· ο σχεδόν σφαιρικός στρεπτόκοκκος απαιτεί υψηλότερη τάση και σε χαμηλότερη συχνότητα από ότι ο κοκκώδης λακτοβάκιλλος. Δεν παύει όμως να υπάρχει το μειονέκτημα του επιπλέον τοιχώματος, δηλαδή τα Gram θετικά βακτήρια έχουν πυκνότερα και πιο παχιά κυτταρικά τοιχώματα από τα Gram αρνητικά βακτήρια και, γενικότερα, τα Gram αρνητικά στελέχη είναι πιο αποτελεσματικά στην ηλεκτροπόρωση, χωρίς απαραίτητα να έχουν περισσότερη αντοχή [Chassy M., 1988]

9. Φυτοφάρμακα

9.1 Carbendazim(Methyl 1H-benzimidazol-2-ylcarbamate)

Πρόκειται για τον μεθυλεστέρα του βενζιμιδαζολοκαρβαμιδικού οξέος (MBC) το οποίο έχει κυκλοφορήσει σαν γεωργικό μυκητοκτόνο με το όνομα carbendazim. Συγκεκριμένα πρόκειται για διασυστηματικό μυκητοκτόνο φυλλώματος και εδάφους και ανήκει στα βενζιμιδαζολικά.. Απορροφάται από τις ρίζες και τους πράσινους ιστούς. Καταπολεμά Ασκομύκητες, Βασιδιομύκητες κ.α. σε σακχαρότευτλα, οπωροφόρα, αμπέλι, καλλωπιστικά, λαχανικά, σιτηρά, ρύζι και βαμβάκι[Καπετανάκης Ε., 2003]

9.2 MCPA(4-Chloro-2-methylphenoxyacetic acid)

Είναι ένα συστηματικό ζιζανιοκτόνο, παράγωγο του φαινοξυ-ακετικού οξέος που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των ετήσιων και πολυετών ζιζανίων στον τομέα των σιτηρών, σε λιβάδια, σε δέντρα και στο γρασίδι. Όπως και μερικά άλλα από τα ζιζανιοκτόνα αυτής της κατηγορίας, το MCPA είναι ένα οξύ, αλλά συχνά παρασκευάζεται ως άλας, όπως το άλας της διαιθανολαμίνης. Το ζιζανιοκτόνο λειτουργεί με συγκέντρωση στις ενεργές, αναπτυσσόμενες περιοχές ενός φυτού (μεριστωματικούς ιστούς) όπου παρεμβαίνει στην πρωτεϊνική σύνθεση, την κυτταρική διαίρεση και τελικά την ανάπτυξη του φυτού. Συγκεκριμένα, η εφαρμογή τους πρέπει να γίνεται από το έδαφος και με προσοχή γιατί καταστρέφουν επίσης τα παρακείμενα δικοτυλήδωνα φυτά. Είναι εστέρες μη διαλυτοί στο νερό ή αμινικά άλατα διαλυτά στο νερό.

Συνήθως περιέχουν και άτομα χλωρίου και τα πλέον επικίνδυνα ανάλογα περιέχουν μέχρι και τρία άτομα χλωρίου όπως η διοξίνη. Τυπικά συμπτώματα της δράσης τους είναι η ανεξέλεγκτη αύξηση, η παραμόρφωση των φύλλων και των μίσχων. Αυτό οφείλεται στο ότι οι ενώσεις αυτές είναι συγγενείς των αυξινών. Η διαφορά με το MCPA είναι ότι ενώ οι αυξίνες δρούν επιλεκτικά στα κύτταρα του φυτού το MCPA δρα ανεξέλεγκτα. Η δράση των φυσικών αυξινών εντοπίζεται στην, μετά από αλληλεπίδραση με την πλασματική μεμβράνη των κυττάρων, σε απελευθέρωση ενός δευτερογενούς διαβιβαστή που διασχίζει το κυτταρόπλασμα μέχρι τον πυρήνα όπου μεταβάλλει την μεταγραφή του DNA. Η επίμονη δράση των MCPA κάνει την μεταγραφή του DNA να παρατείνεται αφύσικα.

Οι υποδοχείς που δεσμεύουν τις αυξίνες και τα MCPA και προκαλούν την δημιουργία των δευτερογενών διαβιβαστών αναγνωρίζουν τα κοινά φαρμακοφόρα των ουσιών αυτών. Μία καρβοξυλομάδα και τους υποκαταστάτες στις θέσεις 2 και 4 του αρωματικού (φαινοξυ) δακτυλίου. Η ύπαρξη ενός ασύμμετρου άνθρακα εξηγεί γιατί μόνο το ένα στερεοϊσομερές έχει βιολογική δράση. [Gimeno et al., 2003]

9.3 OPP(o-phenylphenol)

Η 2-φαινυλοφαινόλη, ή ορθο-φαινυλοφαινόλη, είναι μια οργανική ένωση που αποτελείται από δύο συνδεδεμένα δακτυλίου βενζολίου και μία ομάδα φαινολικού υδροξυλίου.

Είναι ένα βιοκτόνο που χρησιμοποιείται ως συντηρητικό υπό τις εμπορικές ονομασίες Dowicide, Torsite, Preventol, Niracide και πολλά άλλα. Η κύρια χρήση της 2-φαινυλοφαινόλης είναι ως γεωργικό μυκητοκτόνο. Γενικά εφαρμόζεται μετά τη συγκομιδή. Είναι ένα μυκητοκτόνο που χρησιμοποιείται για το κέρωμα των εσπεριδοειδών. Δεν αποτελεί πλέον ένα επιτρεπόμενο πρόσθετο τροφίμων στην Ευρωπαϊκή Ένωση, αλλά εξακολουθεί να επιτρέπεται σε μετασυλλεκτικούς χειρισμούς (μόνο σε τέσσερις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης) [O'Neil M.J., 2001]

9.4 Triclopyr[(4-Chloro-2-methylphenoxy)acetic acid]

Το Triclopyr (3,5,6-τριχλωρο-2-πυριδινυλοξυακετικό οξύ) είναι ένα συστηματικό, ζιζανιοκτόνο φυλλώματος της ομάδας της πυριδίνης. Χρησιμοποιείται για τον έλεγχο πλατύφυλλων ζιζανίων ενώ αφήνει τα αγρωστώδη και κωνοφόρα ανεπηρέαστα.

Το Triclopyr είναι αποτελεσματικό για ξυλώδη φυτά και χρησιμοποιείται για τον έλεγχο αποψίλωσης σε δασικές περιοχές. [Ganapathy C.,(1997)]

10. MRL και υπολειμματικότητα

Ως Μέγιστο Όριο Υπολειμμάτων (Maximum Residue Level - MRL) σε προϊόντα φυτικής προέλευσης, ορίζεται η μέγιστη ποσότητα υπολείμματος που αναμένεται κατά την εφαρμογή ενός φυτοπροστατευτικού προϊόντος σύμφωνα με την Ορθή Γεωργική Πρακτική. Η Ορθή Γεωργική Πρακτική είναι ο τρόπος εφαρμογής ενός εγκεκριμένου φυτοπροστατευτικού προϊόντος σε μία καλλιέργεια, ο οποίος εξασφαλίζει την αποτελεσματικότητα στην χρήση, έχοντας ως κύριες παραμέτρους τη δόση ανά επιφάνεια (γρ. ή κ. εκ. φυτοπροστατευτικού προϊόντος ανά στρέμμα ή εκτάριο), τον αριθμό των εφαρμογών του φυτοπροστατευτικού προϊόντος, τον ψεκαστικό όγκο (λίτρα νερού ανά στρέμμα ή εκτάριο), καθώς και την τελευταία επέμβαση πριν τη συγκομιδή (ημέρες).

Το MRL εκφράζεται σε mg ουσίας ανά kg βάρους φυτικού προϊόντος ή ppm (parts per million = μέρη στο εκατομμύριο) και αναφέρεται πάντα σε συγκεκριμένο συνδυασμό ουσίας και φυτικού προϊόντος. Συνδέεται με τη διαδικασία έγκρισης κυκλοφορίας των φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε

ευρωπαϊκό και σε εθνικό επίπεδο και ορίζεται είτε σε ευρωπαϊκό επίπεδο, οπότε ισχύει υποχρεωτικά για όλα τα Κράτη Μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ε.Ε.), είτε σε επίπεδο ενός Κράτους Μέλους και ισχύει για τις συναλλαγές του συγκεκριμένου Κράτους Μέλους με όλες τις υπόλοιπες χώρες. (ΕΣΥΦ, 2000)

11. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σε αυτήν την εργασία επιδιώκεται η διερεύνηση της δυνατότητας ανάπτυξης κυτταρικού αισθητήρα BERA, βασισμένου σε βακτήρια, με απώτερο σκοπό την αύξηση της αποθηκευσιμότητας των βιοαισθητήρων μέσω της αύξησης της βιωσιμότητας των κυττάρων καθώς επίσης και τη μείωση του κόστους ανάπτυξης και παραγωγής του βιοαισθητήρα (με τη χρήση προκαρυωτικών βακτηρίων αντί για ευκαρυωτικών).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Υλικά και Μέθοδοι

1 Εργαστηριακά υλικά και μηχανήματα.

- i. **Vortex (Bibby Sterilin LTD):** Για την επιτυχημένη ανάμειξη ή διαλυτοποίηση ουσιών σε πολύ μικρές ποσότητες.
- ii. **Ζυγαριά ακριβείας (Denver Instruments):** Για τον ακριβή προσδιορισμό της ποσότητας κάθε ουσίας υπό στερεά μορφή (κόκκοι, σκόνη κ.λπ.).
- iii. **Ηλεκτροπορωτής (Electroporator Thermo EC100):** Συσκευή με την οποία προκαλούνται οπές στην κυτταρική μεμβράνη, ώστε να επιτευχθεί μεμβρανική τροποποίηση (εισαγωγή επιθυμητών ενζύμων - ουσιών σε αυτή).
- iv. **Θάλαμος νηματικής ροής (LaminAir, Holten):** Για την εφαρμογή όλων των μεθόδων κάτω από ασηπτικές συνθήκες, ώστε να αποφευχθούν τυχόν μολύνσεις.
- v. **Κλίβανος αποστείρωσης – αυτόκαυστο (Αφοί Ανδριανόπουλοι):** Για την αποστείρωση υλικών, διαλυμάτων (ανθεκτικών σε υψηλές θερμοκρασίες), εργαλείων και σκευών πριν τη χρήση τους. Η αποστείρωση γίνεται στους 121 °C, σε πίεση 1,2 Atm.
- vi. **Πεχάμετρο (Consort):** Για τον έλεγχο και τη ρύθμιση του pH στα διαλύματα που παρασκευάστηκαν, όπου αυτό κρίθηκε απαραίτητο.
- vii. **Υδατόλουτρο (Κονιδιάρης):** Για τη θέρμανση ή τη διατήρηση σε συγκεκριμένες τιμές θερμοκρασίας ορισμένων διαλυμάτων.
- viii. **Φυγόκεντρος (Biocen):** Για την φυγοκέντρωση διαλυμάτων και το διαχωρισμό των επιθυμητών συστατικών.

2 Αισθητήριο κυτταρικό υλικό

2.1 Βακτήρια *Lactobacillus brevis*

Για την κατασκευή των αισθητήρων χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα *Lactobacillus brevis* από αρχική καλλιέργεια που μας παρέιχε το Εργαστήριο Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό MRS Broth 55 g σε 1lt αποσταγμένου H₂O. Αφήνουμε τα βακτήρια να αναπτύσσονται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία 27-30°C.

2.2. Αντισώματα.

Τα αντισώματα έναντι των μελετηθέντων φυτοπροστατευτικών ουσιών αναπτύχθηκαν από τη συνεργαζόμενη ομάδα της Δρ. Ε. Λιβανίου (Ινστιτούτο Ραδιοϊσοτόπων και Ραδ/κών Προϊόντων, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος) στα πλαίσια του Ευρωπαϊκού Προγράμματος FOODSCAN (No 284462).

2.2.1. Αντίσωμα 56-MCPA

Συγκεντρώσεις αντισώματος 56-MCPA (Διαλυμένα σε 1x PBS)

- Eppendorf A = 5μl + 995μl PBS
 - Eppendorf B = 143μl A + 857μl PBS
- (Αυτό χρησιμοποιείται στην ηλεκτροπόρωση-τροποποίηση)

Συγκεντρώσεις διαλύματος MCPA

- Eppendorf A(5 mg/ml): 10μl A + 990μl PBS
- Eppendorf B(0,05 mg/ml): 10μl B + 990μl PBS
- Eppendorf Γ(0,05 x 10⁻³ mg/ml) = MRL
- Eppendorf Δ(0,1 x 10⁻³ mg/ml) = 2MRL

2.2.2. Αντίσωμα 57-Triclopryr

Συγκεντρώσεις αντισώματος 57-Triclopryr (Διαλυμένα σε 1x PBS)

- Eppendorf A = 5μl + 995μl PBS
 - Eppendorf B = 143μl A + 857μl PBS
- (Αυτό χρησιμοποιείται στην ηλεκτροπόρωση-τροποποίηση)

Συγκεντρώσεις διαλύματος Triclorpyr

- Eppendorf A(1 mg/ml): 10μl A + 990μl PBS
- Eppendorf B(0,01 mg/ml): 10μl B + 990μl PBS
- Eppendorf Γ($0,01 \times 10^{-2}$ mg/ml)= MRL
- Eppendorf Δ($0,02 \times 10^{-2}$ mg/ml)= 2MRL

2.2.3. Αντίσωμα 58- 2-phenylphenol

Συγκεντρώσεις αντισώματος 56-MCPA (Διαλυμένα σε 1x PBS)

- Eppendorf A = 5μl + 995μl PBS
 - Eppendorf B= 143μl A + 857μl PBS
- (Αυτό χρησιμοποιείται στην ηλεκτροπόρωση-τροποποίηση)

Συγκεντρώσεις διαλύματος 2-phenylphenol

- Eppendorf A(5 mg/ml): 10μl A + 990μl PBS
- Eppendorf B(0,05 mg/ml): 10μl B + 990μl PBS
- Eppendorf Γ($0,05 \times 10^{-3}$ mg/ml)= MRL
- Eppendorf Δ($0,1 \times 10^{-3}$ mg/ml)= 2MRL

2.2.4. Αντίσωμα 59-Carbendazim

Συγκεντρώσεις αντισώματος 59-Carbendazim (Διαλυμένα σε 1x PBS)

- Eppendorf A = 5μl + 995μl PBS
 - Eppendorf B = 111μl A + 889μl PBS
- (Αυτό χρησιμοποιείται στην ηλεκτροπόρωση-τροποποίηση)

Συγκεντρώσεις διαλύματος Carbendazim

- Eppendorf A(1 mg/ml): 10μl A + 990μl PBS
- Eppendorf B(0,01 mg/ml): 10μl B + 990μl PBS
- Eppendorf Γ($0,01 \times 10^{-2}$ mg/ml)= MRL
- Eppendorf Δ($0,02 \times 10^{-2}$ mg/ml)= 2MRL

2.3 Σύσταση διαλύματος PBS

Σε 800 ml αποσταγμένο νερό διαλύουμε:

- 7,65 g NaCl
- 1,932 g Na₂HPO₄
- 2,12 g KHPO₄

Ρυθμίζουμε το pH στο 7,2 και προσδιορίζουμε τον τελικό όγκο σε 1L με προσθήκη αποσταγμένου νερού. Τέλος το αποστειρώνουμε.

3 Μέθοδοι

3.1 Καλλιέργεια βακτηρίων

Σε αποστειρωμένες κωνικές φιάλες εμβολιάζουμε από μία ήδη υπάρχουσα καλλιέργεια βακτηρίων όσο % θέλουμε:

Για εμβόλιο 2% :Σε 10ml θρεπτικού υλικού βάζουμε 200μl από την προηγούμενη καλλιέργεια

Για εμβόλιο 5% :Σε 10ml θρεπτικού υλικού βάζουμε 500μl από την προηγούμενη καλλιέργεια

Για εμβόλιο 10%: Σε 10ml θρεπτικού υλικού βάζουμε 1000μl από την προηγούμενη καλλιέργεια

3.2 Μέτρηση απορρόφησης

Για να μετρήσουμε την απορρόφηση και να δούμε σε ποια φάση βρίσκεται η καλλιέργεια των βακτηρίων:

- Βαθμονομούμε την φωτομετρική μέτρηση της ανάπτυξης της καλλιέργειας με χρήση θρεπτικού υλικού των βακτηρίων σαν μάρτυρα

- Βάζουμε στην κυβέτα περίπου 3ml από την καλλιέργειά μας και μετράμε την απορρόφηση (600nm)

Συνήθως όταν έχουμε απορρόφηση 0,5-0,8 τα βακτήρια βρίσκονται στη λογαριθμική φάση ανάπτυξής τους.

3.3 Ηλεκτροπόρωση- Τροποποίηση βακτηρίων με τα αντισώματα

- Διαμοιρασμός 1 ml καλλιέργειας βακτηρίων ανά eppendorf (eppendorfs των 1,5 ml)
- Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 10000 rpm
- Αφαίρεση υπερκείμενου
- Προσθήκη 1ml PBS/eppendorf και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος
- Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 10000rpm
- Αφαίρεση υπερκείμενου
- Προσθήκη 40μl PBS/eppendorf και 400ml αντίσωμα/eppendorf – επαναδιαλυτοποίηση
- Αφήνουμε τα eppendorf στον πάγο για 20 λεπτά
- Ηλεκτροπορώνουμε στα 1800V x 2 φορές
- Αφήνουμε τα eppendorf σε ηρεμία για 1h
- Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 10000rpm
- Αφαίρεση υπερκείμενου
- Προσθήκη 1ml θρεπτικό υλικό/eppendorf και επαναδιαλυτοποίηση του pellet



**Εικόνα 3: Ηλεκτροπορωτής
(Electroporator Thermo EC100)**



**Εικόνα 4 : Κυβέτες
ηλεκτροπόρωσης**

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ

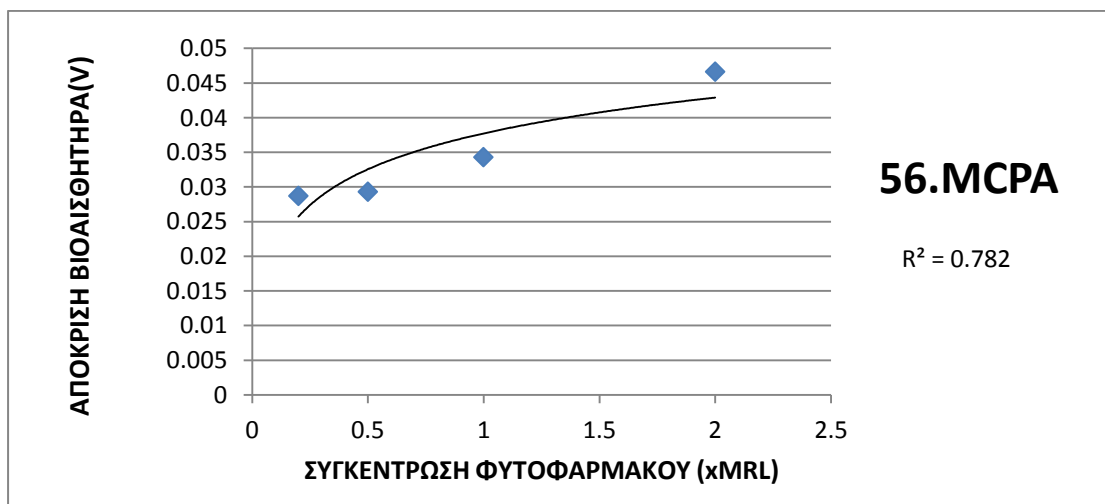
Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις σε επίπεδο διαφοράς συγκέντρωσης, διαφορά στον τρόπο αποθήκευσης καθώς και σε διερευνητικές αποκρίσεις σχετικά με το είδος και το πλήθος των αντισωμάτων προς ενσωμάτωση.

Συγκεκριμένα, οι μετρήσεις έγιναν σε 2 συγκεντρώσεις MRL και 2X MRL φυτοφαρμάκων. Σαν μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε διάλυμα το οποίο δεν περιείχε υπολείμματα φυτοφαρμάκων. Έγιναν τέσσερις επαναλήψεις ανά δείγμα και ολόκληρο το πείραμα επαναλήφθηκε δύο φορές. Οι μετρήσεις είχαν διάρκεια 180 sec και έδιναν τιμές σε Volt/sec. Έπειτα, με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος Excel, σε κάθε μέτρηση υπολογίστηκε ο μέσος όρος μεταξύ των επαναλήψεων, η τυπική απόκλιση και το τυπικό σφάλμα σε κάθε μέτρηση. Τέλος, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση ANOVA, υπολογισμός του συντελεστή γραμμικής συσχέτισης Pearson και student's t-test, ανάλογα με τον χειρισμό.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1 Πρότυπες Καμπύλες

Μέτρηση απόκρισης βιοαισθητήρα σε καθορισμένες συγκεντρώσεις φυτοφαρμάκου

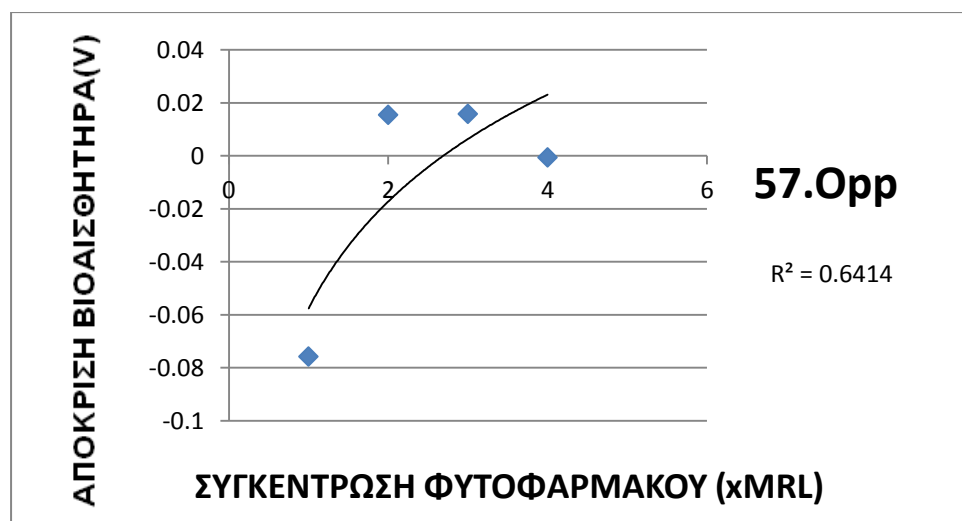


Διάγραμμα 1: Μέσος όρος απόκρισης κυττάρων *Lactobacillus brevis* σε συγκεντρώσεις 0.5,0.2,1,2xMRL, MCPA με τη συσκευή microSENSESlab.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ

Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	0,000841	3	0,00028	0,922272	0,459561	3,490295
Μέσα στις ομάδες	0,003647	12	0,000304			
Σύνολο	0,004488	15				

Στα πιο πάνω διαγράμματα βλέπουμε τον μέσο όρο των μετρήσεων για κάθε φυτοφάρμακο σε κάθε συγκέντρωση ξεχωριστά. Σύμφωνα με τα παραπάνω, παρατηρείται σχετική γραμμικότητα όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του φυτοφαρμάκου παρόλο που οι μετρήσεις δεν είναι στατιστικώς σημαντικές. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στο μικρό αριθμό επαναλήψεων. Παρόλα αυτά, ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης του Pearson βρέθηκε ίσος με 0,98, γεγονός που υποδηλώνει μια πολύ ισχυρή γραμμική συσχέτιση.

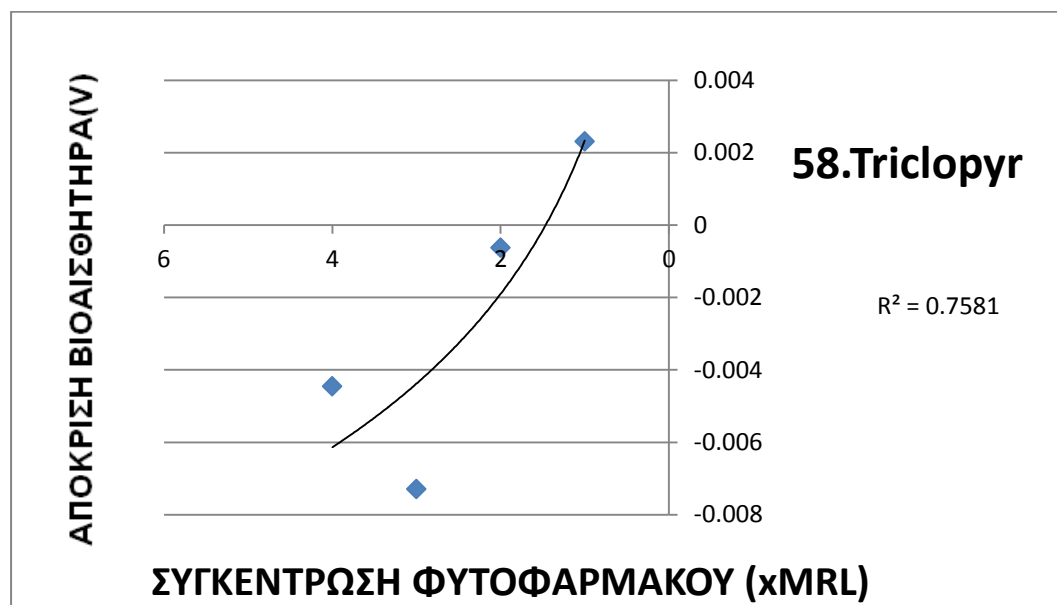


Διάγραμμα 2: Μέσος όρος απόκρισης κυττάρων *Lactobacillus brevis* σε συγκεντρώσεις 0.5,0.2,1,2xMRL, 2-phenylphenol με τη συσκευή microSENSEslab.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ

Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	0,02387	3	0,00795	52,562	3,56E-07	3,49029
Μέσα στις ομάδες	0,00181	12	0,00015			
Σύνολο	0,02568	15				

Παρομοίως με τα ανωτέρω, και εδώ παρατηρείται γραμμική αύξηση της απόκρισης του βιοαισθητήρα, με την ανάλογη αύξηση της συγκέντρωσης. Από στατιστικής άποψης, παρατηρούμε ότι $F_{crit} < F$, άρα τα αποτελέσματα είναι στατιστικώς σημαντικά. Ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης του Pearson ισούται με 0,47, συνεπώς υπάρχει μία ασθενής γραμμική συσχέτιση.

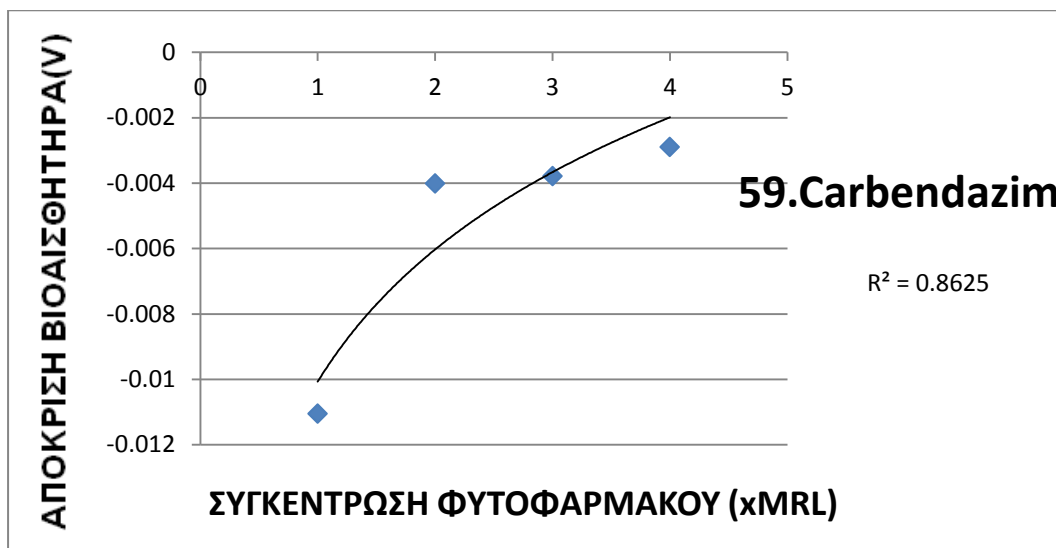


Διάγραμμα 3: Μέσος όρος απόκρισης κυττάρων *Lactobacillus brevis* σε συγκεντρώσεις 0.5,0.2,1,2xMRL, Triclopyr με τη συσκευή microSENSEslab.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ

Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	0,00013	3	4,45E-05	3,69874	0,04289	3,49029
Μέσα στις ομάδες	0,00014	12	1,2E-05			
Σύνολο	0,00027	15				

Σε σχέση με τα προηγούμενα διαγράμματα, εδώ παρατηρούμε αναστροφή της γραμμικότητας και χαμηλή στατιστική σημαντικότητα. Ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης του Pearson όμως ισούται με -0,68 άρα έχουμε μέση γραμμική συσχέτιση.



Διάγραμμα 4: Μέσος όρος απόκριση κυτάρων *Lactobacillus brevis* σε συγκεντρώσεις 0.5,0.2,1,2xMRL, Carbendazim με τη συσκευή microSENSESlab.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ

Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	0,00032	9	0,0001	1,90174	0,1831	3,49029
Μέσα στις ομάδες	0,00069	2	5,76E-05	4	8	5
Σύνολο	0,00102	1				
		15				

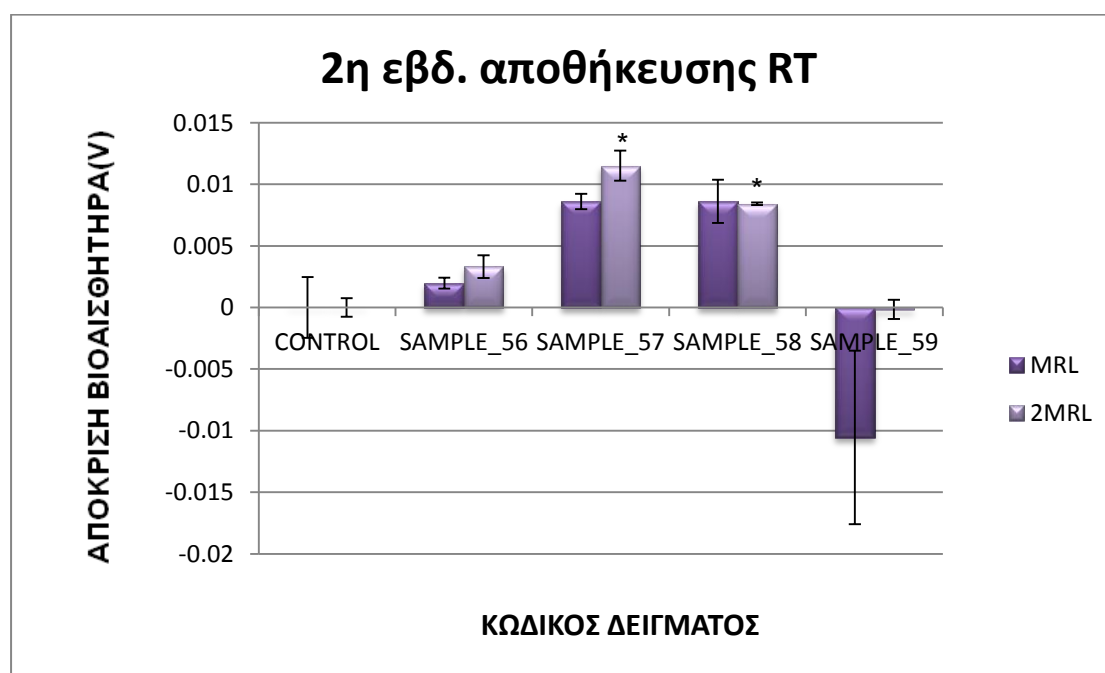
Όπως φαίνεται και από τα διαγράμματα επαναλαμβάνεται το μοτίβο που είδαμε και στην πρότυπη καμπύλη του MCPA, δηλαδή ναι μεν γραμμικό αλλά μη στατιστικά σημαντικό. Αντιθέτως, ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης του Pearson ισούται με 0,71, που υποδηλώνει μια ισχυρή γραμμική συσχέτιση.

2 Αποθηκευσιμότητα σε θερμοκρασία δωματίου(RT)

Στον συγκεκριμένο χειρισμό τα βακτήρια αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου μετά την τροποποίηση και χρησιμοποιούνταν σε μετρήσεις ανά δύο εβδομάδες, δύο επαναλήψεις ανά εβδομάδα.

ΥΠΟΜΝΗΜΑ

Ab	Ουσία
56	MCPA
57	Triclopyr
58	Opp(2-phenylphenol)
59	Carbendazim

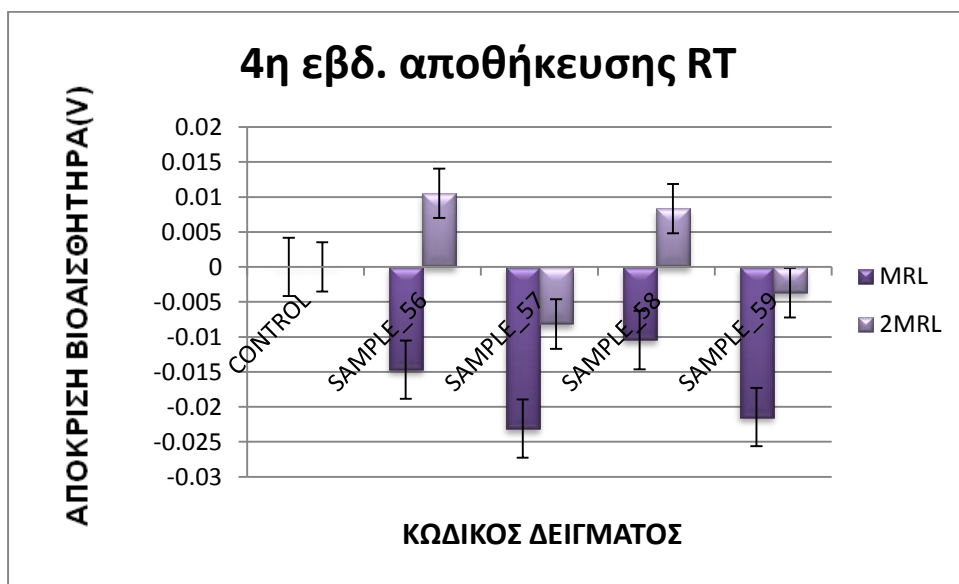


Διάγραμμα 5: Μέσος όρος απόκρισης κυττάρων *Lactobacillus brevis*, την 2^η εβδομάδα αποθήκευσης, σε συγκεντρώσεις 1xMRL & 2xMRL στα τέσσερα φυτοφάρμακα με τη συσκευή microSENSESlab. *p<0,05, student's t-test.

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα παρατηρούμε τα εξής:

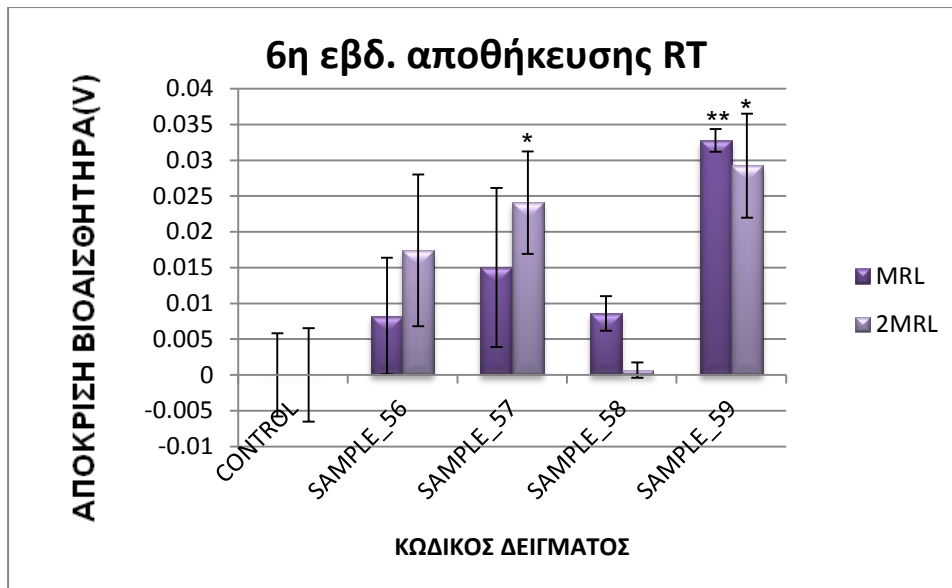
-Είναι θετικό το γεγονός ότι υπάρχει σε μεγάλο ποσοστό, στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) σε σχέση με τον μάρτυρα και για τα δύο επίπεδα φόρτισης (MRL, 2MRL) στα δείγματα 57 και 58.

-Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με κύτταρα τα οποία είχαν αποθηκευτεί για δύο εβδομάδες, συνεπώς παρατηρείται μείωση του ορίου ανιχνευσιμότητας της μεθόδου καθώς μόνο για τιμές 2MRL παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση σε σχέση με το μάρτυρα.



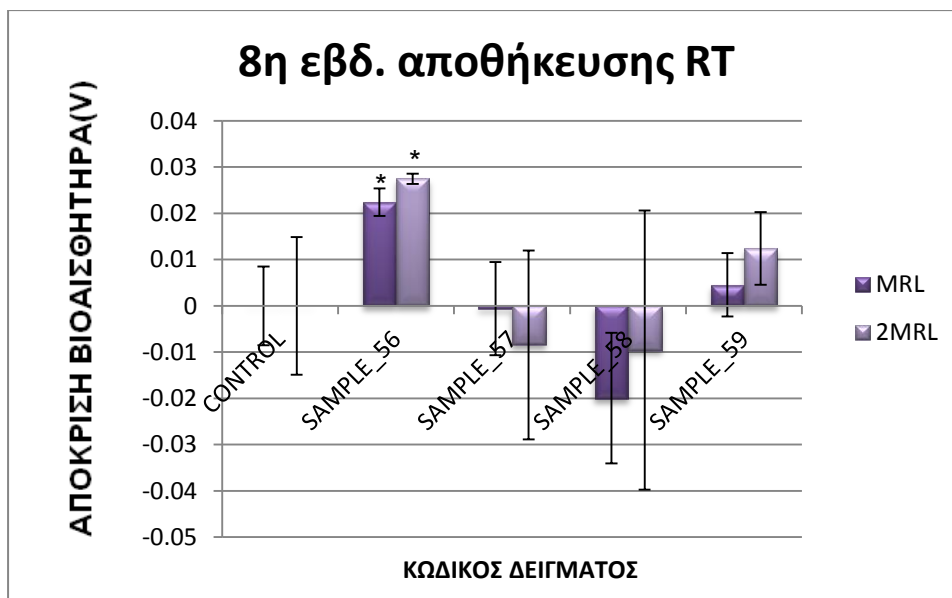
Διάγραμμα 6: Μέσος όρος απόκρισης κυττάρων *Lactobacillus brevis*, την 4^η εβδομάδα αποθήκευσης, σε συγκεντρώσεις 1xMRL & 2xMRL στα τέσσερα φυτοφάρμακα με τη συσκευή microSENSESlab.

Παρατηρούμε ότι την 4^η εβδομάδα, δεν προκύπτουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ δειγμάτων και του μάρτυρα.



Διάγραμμα 7: Μέσος όρος απόκρισης κυττάρων *Lactobacillus brevis*, την 6^η εβδομάδα αποθήκευσης, σε συγκεντρώσεις 1xMRL & 2xMRL στα τέσσερα φυτοφάρμακα με τη συσκευή microSENSESlab. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$, student's t-test.

Κατά την έκτη εβδομάδα μετρήσεων παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική διαφορά στο δείγμα 59 στο MRL, όσο και στα 2MRL. Επιπλέον στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε και στο δείγμα 57 στα 2MRL.



Διάγραμμα 8: Μέσος όρος απόκρισης κυττάρων *Lactobacillus brevis*, την 8^η εβδομάδα αποθήκευσης, σε συγκεντρώσεις 1xMRL & 2xMRL στα τέσσερα φυτοφάρμακα με τη συσκευή microSENSESlab. * $p < 0,05$, student's t-test.

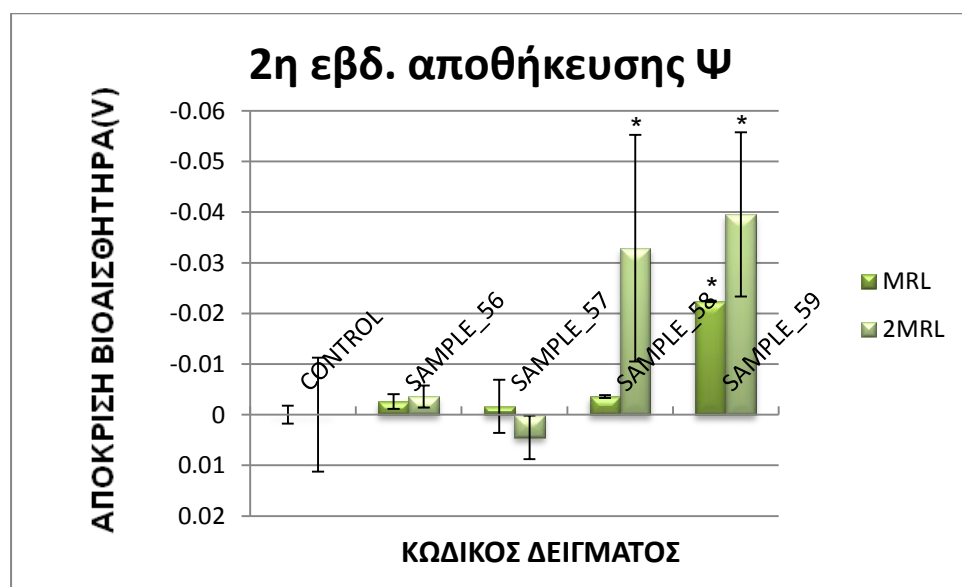
Κατά την όγδοη εβδομάδα (διάγραμμα 8) μετρήσεων παρατηρήθηκε ότι μόνο το δείγμα 56 έδωσε στατιστικά σημαντικές αποκρίσεις τόσο στο MRL όσο και στα 2MRL.

3 Αποθηκευσιμότητα σε θερμοκρασία ψυγείου(Ψ)

Στον συγκεκριμένο χειρισμό τα βακτήρια αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία ψυγείου μετά την τροποποίηση και χρησιμοποιούνταν σε μετρήσεις ανά δύο εβδομάδες, δύο επαναλήψεις ανά εβδομάδα.

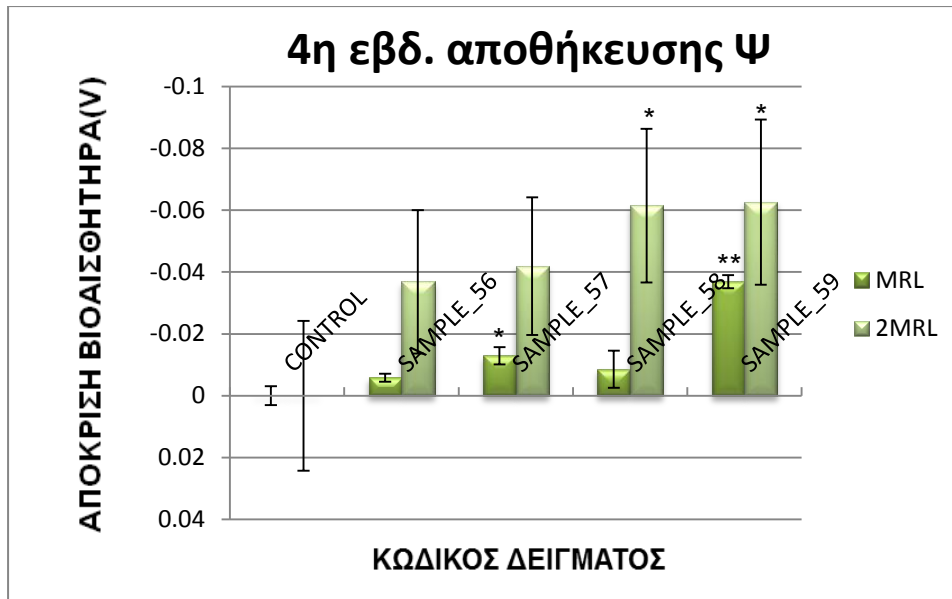
ΥΠΟΜΝΗΜΑ

Ab	Ουσία
56	MCPA
57	Triclopyr
58	Opp(2-phenylphenol)
59	Carbendazim



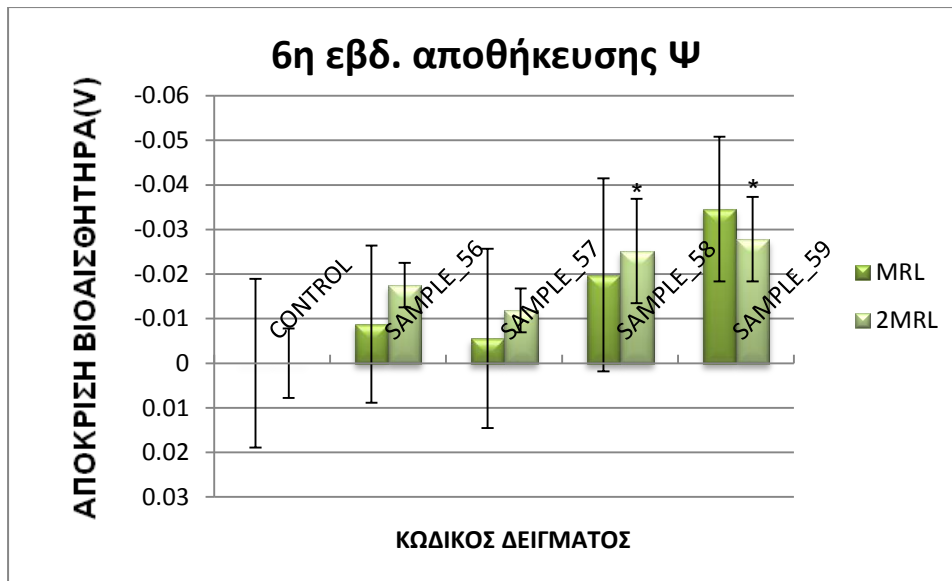
Διάγραμμα 9: Μέσος όρος απόκρισης κυττάρων *Lactobacillus brevis*, την 2^η εβδομάδα αποθήκευσης, σε συγκεντρώσεις 1xMRL & 2xMRL στα τέσσερα φυτοφάρμακα με τη συσκευή microSENSEslab. *p<0,05, student's t-test.

Κατά την δεύτερη εβδομάδα αποθήκευσης σε ψύξη, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τον μάρτυρα στα MRL για τα δείγματα 58 και 59. Παράλληλα, στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τον μάρτυρα παρατηρήθηκαν στα 2MRL μόνο στο δείγμα 59.



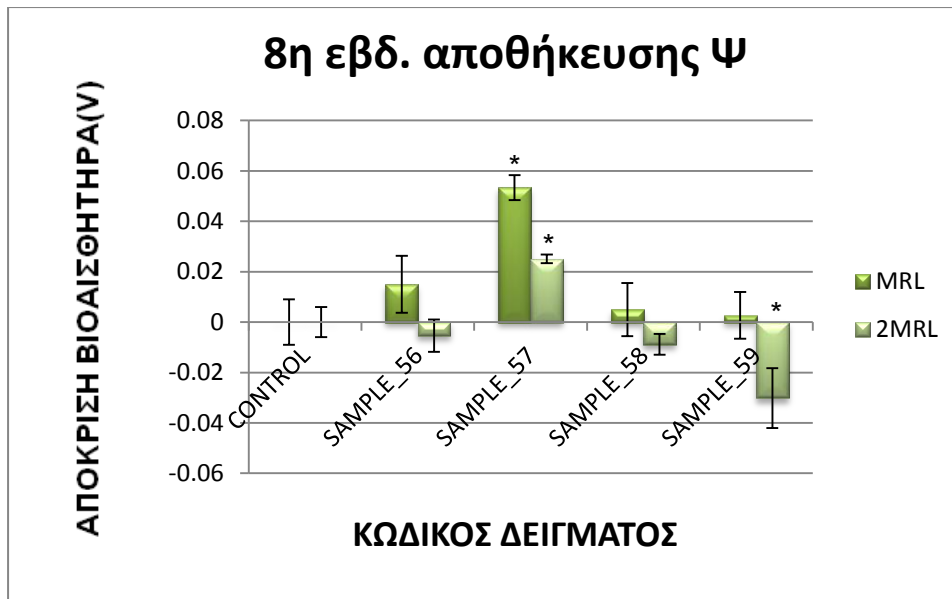
Διάγραμμα 10: Μέσος όρος απόκρισης κυττάρων *Lactobacillus brevis*, την 4η εβδομάδα αποθήκευσης, σε συγκεντρώσεις 1xMRL & 2xMRL στα τέσσερα φυτοφάρμακα με τη συσκευή microSENSESlab.* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$, student's t-test.

Κατά την τέταρτη εβδομάδα αποθήκευσης σε ψύξη, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές των αποκρίσεων σε σχέση με τον μάρτυρα, τόσο στο δείγμα 57 όσο και στο δείγμα 59 στα MRL. Στα 2MRL παρά τις υψηλές τυπικές αποκλίσεις των αποκρίσεων, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα δείγματα 58 και 59.



Διάγραμμα 11: Μέσος όρος απόκρισης κυττάρων *Lactobacillus brevis*, την 6η εβδομάδα αποθήκευσης, σε συγκεντρώσεις 1xMRL & 2xMRL στα τέσσερα φυτοφάρμακα με τη συσκευή microSENSESlab.* $p < 0,05$, student's t-test.

Από το διάγραμμα της έκτης εβδομάδας προκύπτει ότι μόνο τα δείγματα 58 και 59 δίνουν στατιστικά σημαντικές αποκρίσεις σε σχέση με τον μάρτυρα στα 2MRL. Στην συγκέντρωση MRL, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές αποκρίσεις



Διάγραμμα 12: Μέσος όρος απόκρισης κυττάρων *Lactobacillus brevis*, την 8η εβδομάδα αποθήκευσης, σε συγκεντρώσεις 1xMRL & 2xMRL στα τέσσερα φυτοφάρμακα με τη συσκευή microSENSESlab.

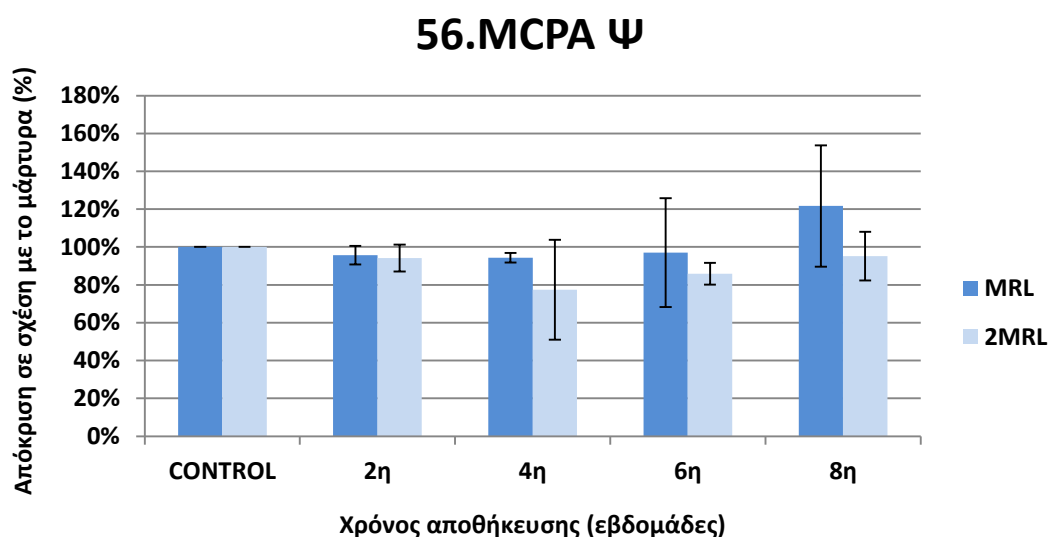
Στην όγδοη εβδομάδα αποθήκευσης σε ψύξη προέκυψε ότι στην συγκέντρωση MRL, μόνο το δείγμα 57 παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά στις αποκρίσεις του, σε σχέση με τον μάρτυρα. Στη συγκέντρωση 2MRL, στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τον μάρτυρα παρουσίασαν τα δείγματα 57 και 59.

ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

Από τα πειράματα αποθηκευσιμότητας μπορούμε να παρατηρήσουμε πως οι αποκρίσεις των τροποποιημένων βακτηρίων επηρεάζονται από την διάρκεια αποθήκευσης μετά την τροποποίηση καθώς και από τον τρόπο χειρισμού με βάση την θερμοκρασία.

Συγκεντρωτικά διαγράμματα φυτοφαρμάκων

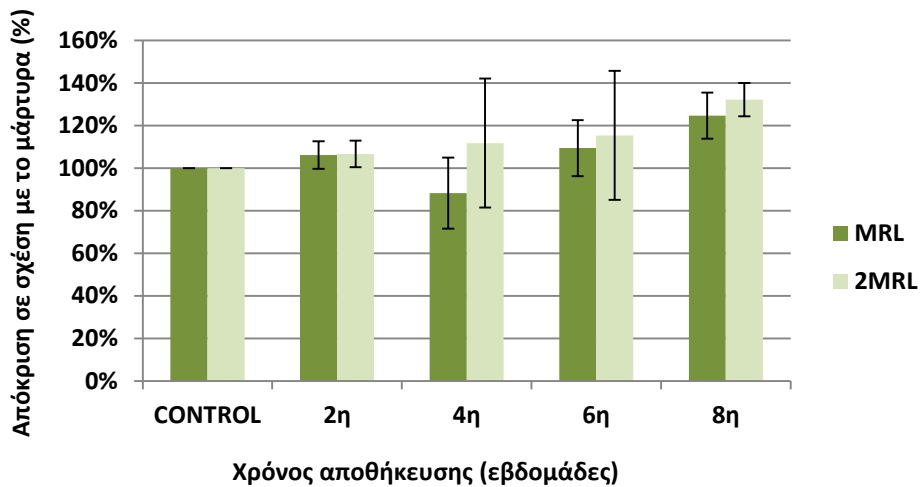
Παρακάτω δίδονται οι αποκρίσεις του βιοαισθητήρα για κάθε ουσία ξεχωριστά στο πέρας των εβδομάδων σε θερμοκρασία ψυγείου (Ψ) και θερμοκρασία δωματίου (RT) και σε συγκεντρώσεις 1xMRL & 2xMRL. Τα διαγράμματα παρουσιάζουν την μεταβολή της απόκρισης του αισθητήρα, σε σχέση με το μάρτυρα, ανά δύο εβδομάδες αποθήκευσης.



Διάγραμμα 13: Μέσος όρος απόκρισης κυττάρων *Lactobacillus brevis*, σε συγκεντρώσεις 1xMRL & 2xMRL MCPA, αποθηκευμένα σε θερμοκρασία ψυγείου, με τη συσκευή microSENSESlab σε διάστημα οκτώ εβδομάδων.

-Παρατηρούμε ότι, το δείγμα 56 δεν παρουσιάζει αναλογική αύξηση της απόκρισης όταν αυξάνεται η συγκέντρωση της ουσίας στο διάλυμα, στο πέρας των εβδομάδων.

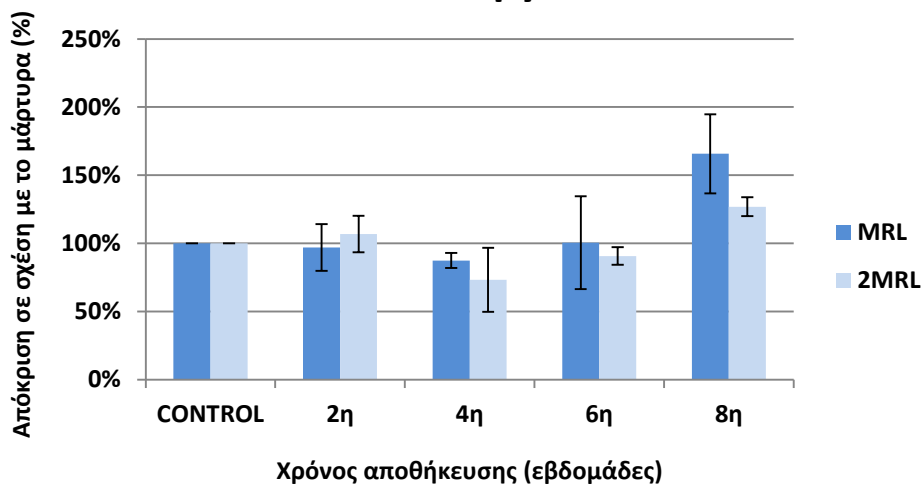
56. MCPA RT



Διάγραμμα 14: Μέσος όρος απόκρισης κυττάρων *Lactobacillus brevis*, σε συγκεντρώσεις 1xMRL & 2xMRL MCPA, αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου, με τη συσκευή microSENSESlab σε διάστημα οκτώ εβδομάδων.

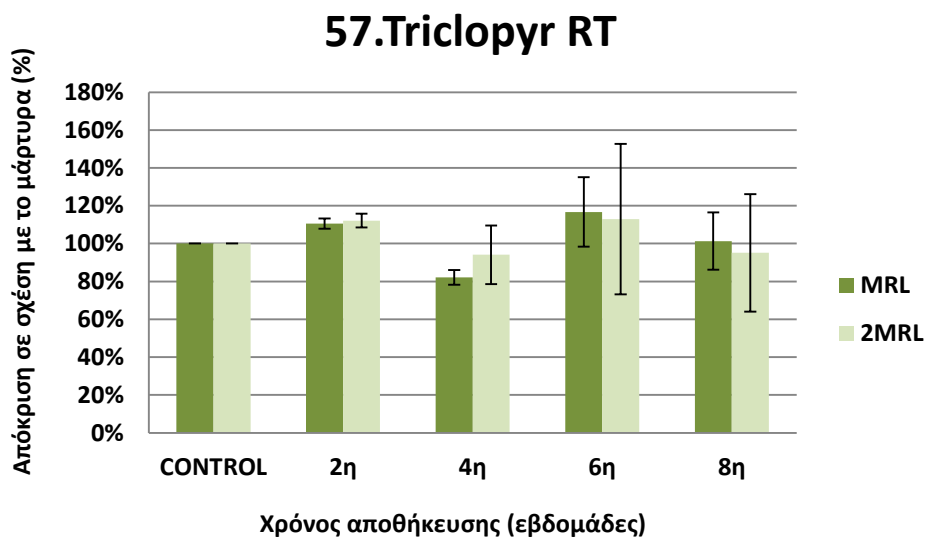
-Σε συνέπεια, με την προηγούμενη μέτρηση σε θερμοκρασία ψυγείου, η εικόνα δεν διαφοροποιείται αισθητά. Κατά την όγδοη εβδομάδα αποθήκευσης, παρατηρείται μια ελαφρά διαφοροποίηση στις αποκρίσεις των αισθητήρων σε σχέση με τους μάρτυρες τόσο στο MRL, όσο και στα 2MRL, η οποία πιθανώς να οφείλεται σε ανάπτυξη μικροοργανισμών στο θρεπτικό μέσο.

57. Triclopyr Ψ



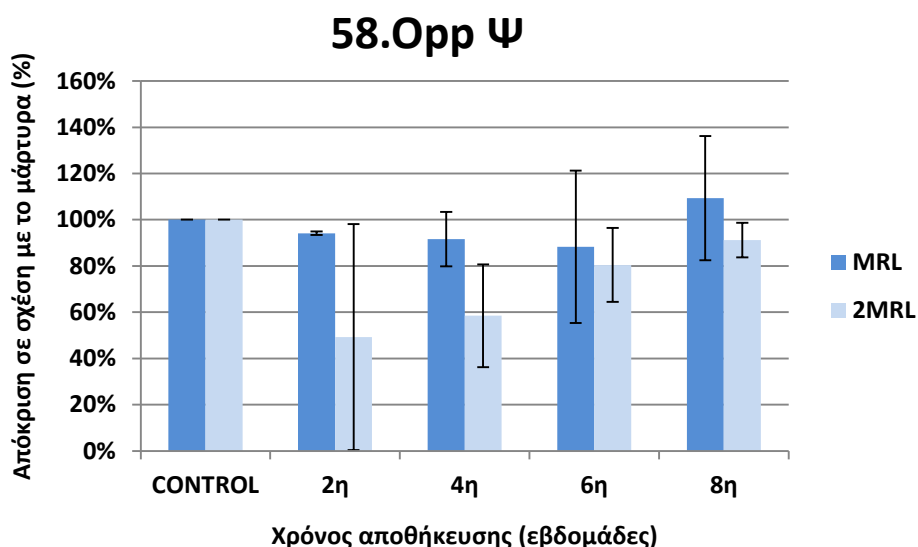
Διάγραμμα 15: Μέσος όρος απόκρισης κυττάρων *Lactobacillus brevis*, σε συγκεντρώσεις 1xMRL & 2xMRL Triclopyr, αποθηκευμένα σε θερμοκρασία ψυγείου, με τη συσκευή microSENSESlab σε διάστημα οκτώ εβδομάδων.

-Στην περίπτωση του Triclopryr , με αποθήκευση σε θερμοκρασία ψυγείου, παρατηρείται ελαφρά διαφοροποίηση της απόκρισης του βιοαισθητήρα σε σχέση με τους μάρτυρες στο MRL. Στα 2MRL, παρατηρείται αισθητή διαφορά στις αποκρίσεις του βιοαισθητήρα από την τέταρτη έως την όγδοη εβδομάδα.



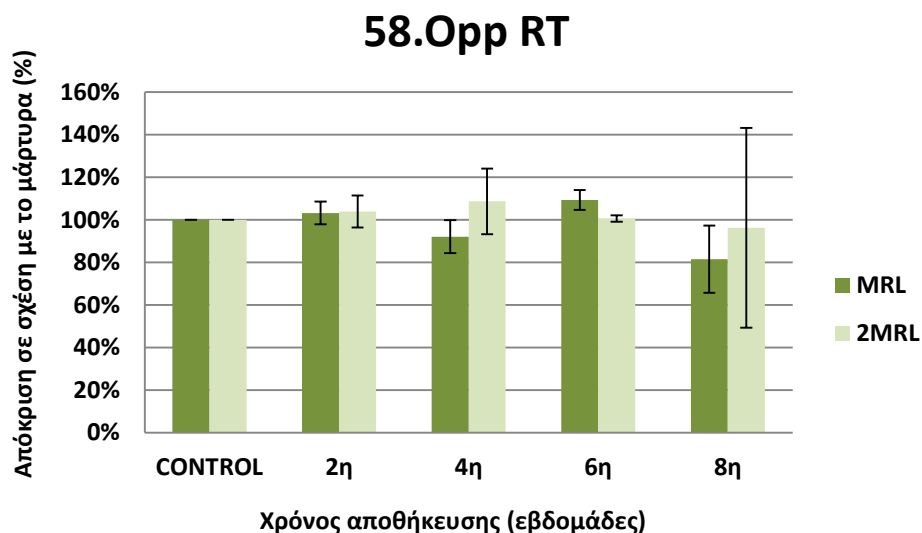
Διάγραμμα 16: Μέσος όρος απόκρισης κυττάρων *Lactobacillus brevis*, σε συγκεντρώσεις 1xMRL & 2xMRL Triclopryr, αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου, με τη συσκευή microSENSESlab σε διάστημα οκτώ εβδομάδων.

-Στην περίπτωση του Triclopryr, οι αποκρίσεις διαφοροποιούνται την δεύτερη και την τέταρτη εβδομάδα από τους μάρτυρες στο MRL. Στα 2MRL, ελαφρά διαφοροποίηση της απόκρισης των βιοαισθητήρων από τους μάρτυρες, παρατηρείται μόνο κατά την δεύτερη εβδομάδα αποθήκευσης.



Διάγραμμα 17: Μέσος όρος απόκρισης κυττάρων *Lactobacillus brevis*, σε συγκεντρώσεις 1xMRL & 2xMRL Opp, αποθηκευμένα σε θερμοκρασία ψυγείου, με τη συσκευή microSENSESlab σε διάστημα οκτώ εβδομάδων.

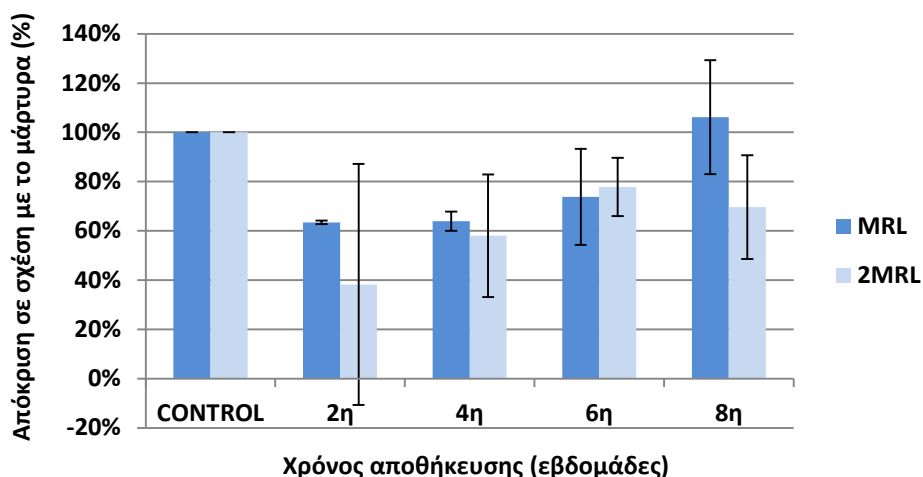
-Στην περίπτωση του 2-phenylphenol, σε βακτήρια αποθηκευμένα σε θερμοκρασία ψυγείου, παρατηρείται διαφοροποίηση της απόκρισης από τους μάρτυρες, μόνο την δεύτερη εβδομάδα για το MRL. Στα 2MRL, η διαφορά σε σχέση με τους μάρτυρες, παρατηρείται σε όλες τις εβδομάδες αποθήκευσης, παρά τα μεγάλα τυπικά σφάλματα.



Διάγραμμα 18: Μέσος όρος απόκρισης κυττάρων *Lactobacillus brevis*, σε συγκεντρώσεις 1xMRL & 2xMRL Opp, αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου, με τη συσκευή microSENSESlab σε διάστημα οκτώ εβδομάδων.

Στην περίπτωση του opp, κατά την αποθήκευση των βιοαισθητήρων σε θερμοκρασία δωματίου, παρατηρείται διαφοροποίηση από τους μάρτυρες, στις αποκρίσεις του MRL, στην έκτη και στην όγδοη εβδομάδα. Στα 2MRL, δεν υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση καθ' όλη την διάρκεια αποθήκευσης των βιοαισθητήρων.

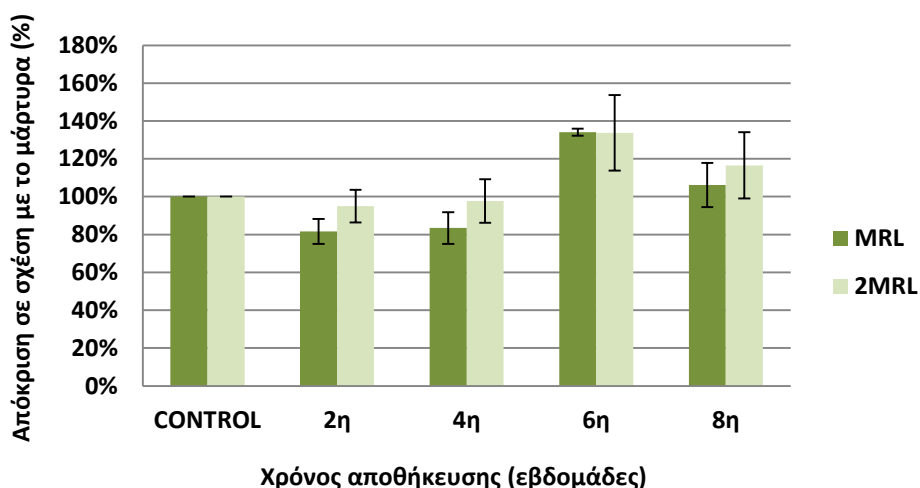
59. Carbendazim Ψ



Διάγραμμα 19: Μέσος όρος απόκρισης κυττάρων *Lactobacillus brevis*, σε συγκεντρώσεις 1xMRL & 2xMRL Carbendazim, αποθηκευμένα σε θερμοκρασία ψυγείου, με τη συσκευή microSENSESlab σε διάστημα οκτώ εβδομάδων.

-Στο MRL, παρατηρείται γραμμική μείωση της μεταβολής της απόκρισης των αισθητήρων σε σχέση με τον μάρτυρα, η οποία είναι ιδιαίτερα έντονη από την δεύτερη έως την έκτη εβδομάδα. Στα 2MRL, υπάρχει μεν αξιοσημείωτη διαφορά των αποκρίσεων από τις αντίστοιχες των μαρτύρων, χωρίς όμως να παρουσιάζεται κάποια γραμμικότητα.

59. Carbendazim RT



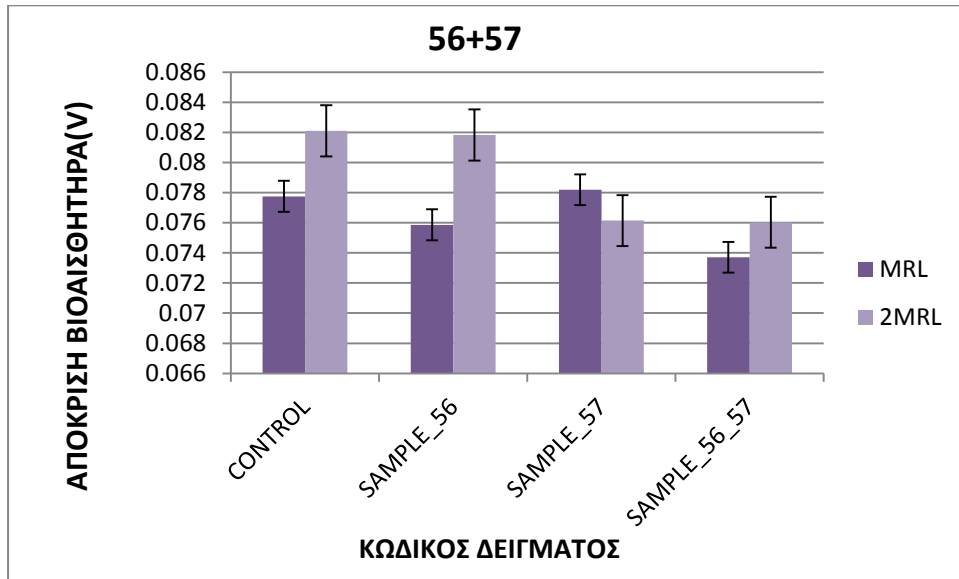
Διάγραμμα 20: Μέσος όρος απόκρισης κυττάρων *Lactobacillus brevis*, σε συγκεντρώσεις 1xMRL & 2xMRL Carbendazim, αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου, με τη συσκευή microSENSESlab σε διάστημα οκτώ εβδομάδων.

Στο MRL, παρατηρείται εμφανής διαφοροποίηση από τις αποκρίσεις των μαρτύρων, από την δεύτερη έως την έκτη εβδομάδα. Στα 2MRL, η διαφοροποίηση σε σχέση με τις αποκρίσεις των μαρτύρων, παρατηρείται μόνο την έκτη εβδομάδα αποθήκευσης.

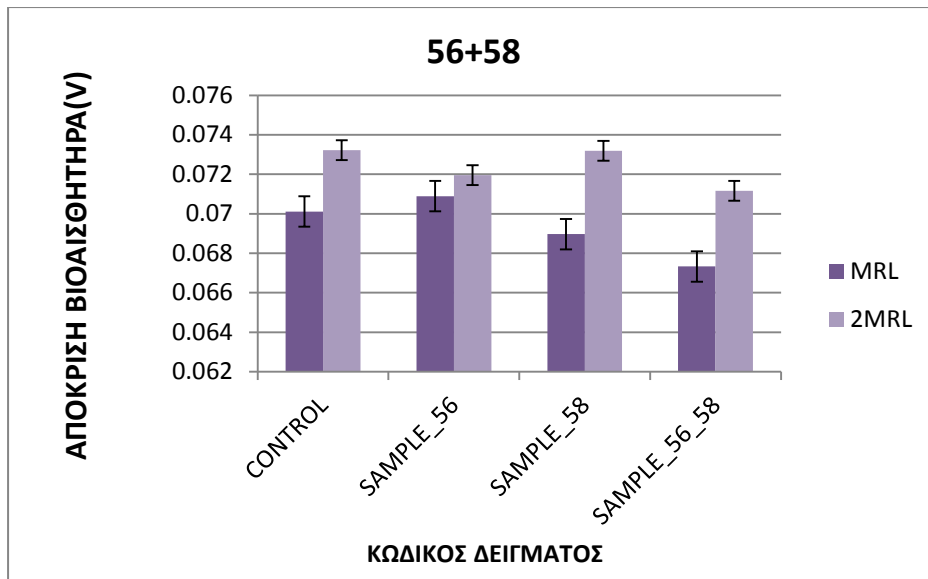
4 Διδύναμοι βιοαισθητήρες

Σε αυτόν τον πειραματικό χειρισμό τροποποιήσαμε βακτήρια στην εκθετική φάση ανάπτυξης με δύο αντισώματα, σε ίση ποσότητα το καθένα. Η αποθήκευση έγινε σε θερμοκρασία ψυγείου και η μέτρηση επαναλήφθηκε δύο φορές ανά συνδυασμό.

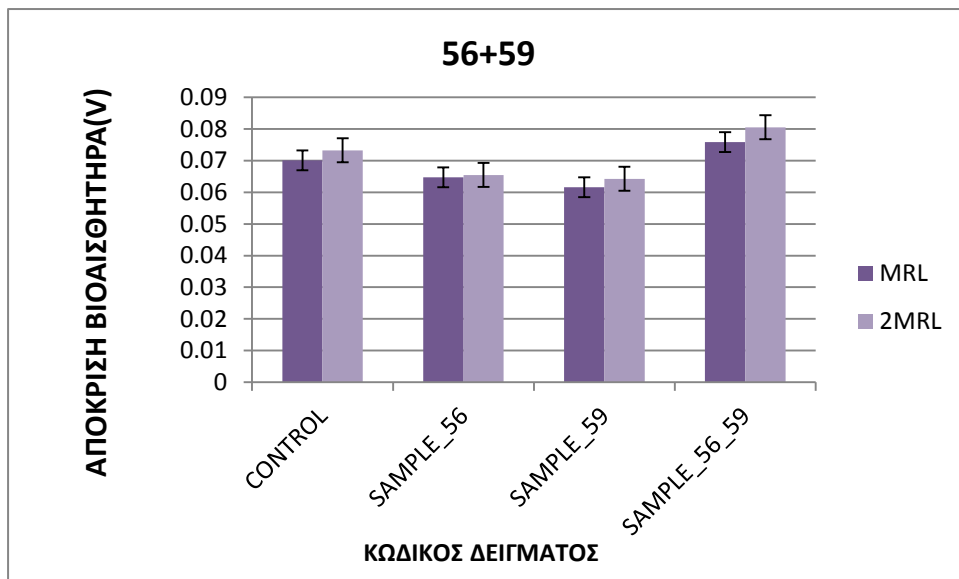
Παρακάτω παρατίθενται οι ανά δύο συνδυασμοί που δοκιμάστηκαν και τα αποτελέσματα που προέκυψαν.



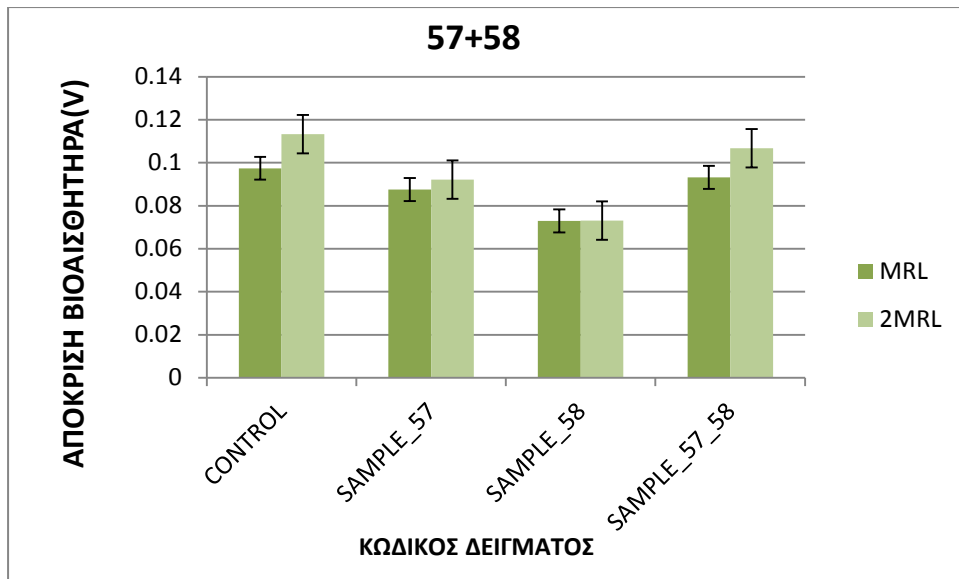
Διάγραμμα 21: Μέσος όρος απόκρισης κυττάρων *Lactobacillus brevis* τροποποιημένα με αντισώματα MCPA και Triclorpyr, σε συγκεντρώσεις 1xMRL & 2xMRL, αποθηκευμένα σε θερμοκρασία ψυγείου, με τη συσκευή microSENSESlab.



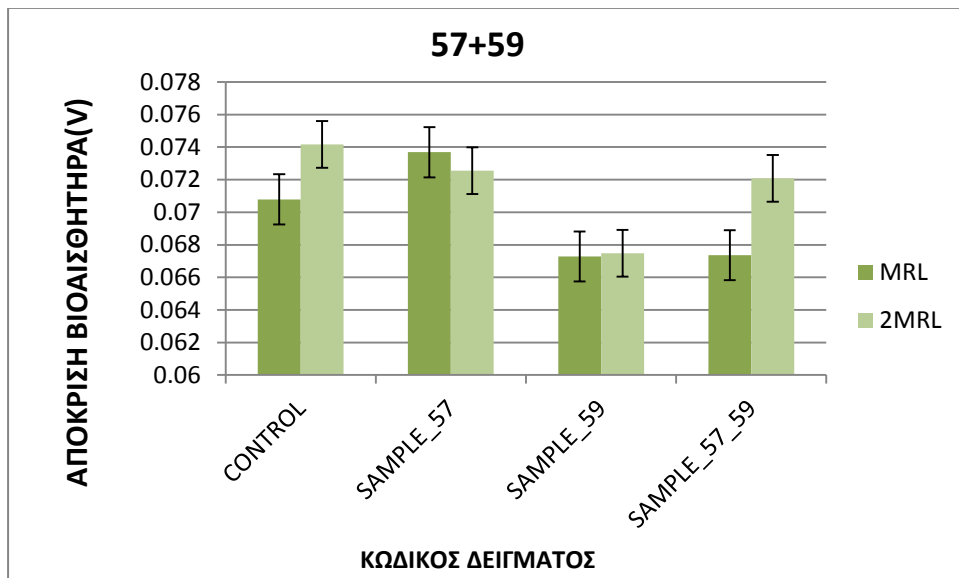
Διάγραμμα 22: Μέσος όρος απόκρισης κυττάρων *Lactobacillus brevis* τροποποιημένα με αντισώματα MCPA και Orp, σε συγκεντρώσεις 1xMRL & 2xMRL, αποθηκευμένα σε θερμοκρασία ψυγείου, με τη συσκευή microSENSESlab.



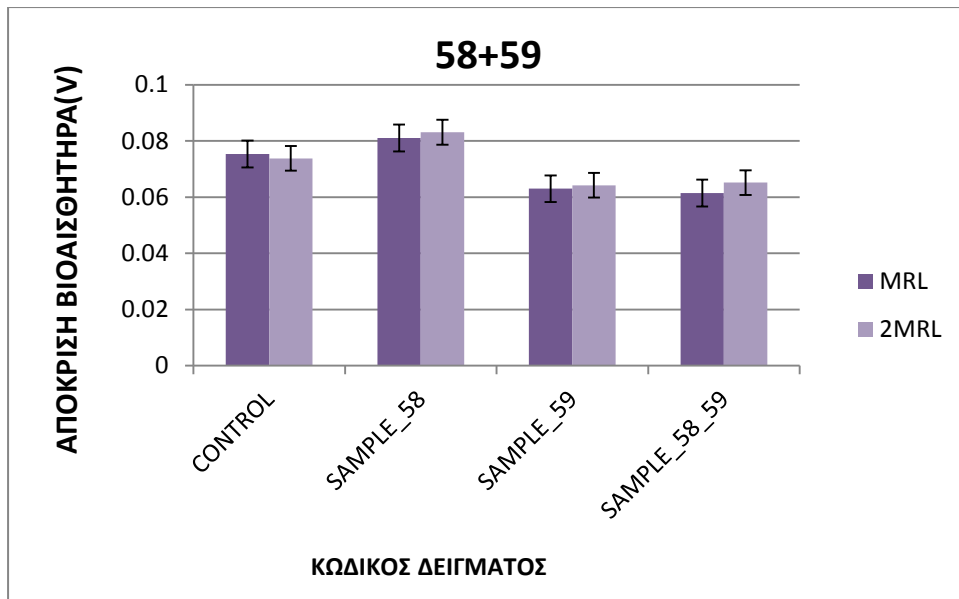
Διάγραμμα 23: Μέσος όρος απόκρισης κυττάρων *Lactobacillus brevis* τροποποιημένα με αντισώματα MCPA και Carbendazim, σε συγκεντρώσεις 1xMRL & 2xMRL, αποθηκευμένα σε θερμοκρασία ψυγείου, με τη συσκευή microSENSESlab.



Διάγραμμα 24: Μέσος όρος απόκρισης κυττάρων *Lactobacillus brevis* τροποποιημένα με αντισώματα Triclorpyr και Opp, σε συγκεντρώσεις 1xMRL & 2xMRL, αποθηκευμένα σε θερμοκρασία ψυγείου, με τη συσκευή microSENSESlab.



Διάγραμμα 25: Μέσος όρος απόκρισης κυττάρων *Lactobacillus brevis* τροποποιημένα με αντισώματα Triclorpyr και Carbendazim, σε συγκεντρώσεις 1xMRL & 2xMRL, αποθηκευμένα σε θερμοκρασία ψυγείου, με τη συσκευή microSENSESlab.



Διάγραμμα 26: Μέσος όρος απόκρισης κυτάρων *Lactobacillus brevis* τροποποιημένα με αντισώματα Opp και Carbendazim, σε συγκεντρώσεις 1xMRL & 2xMRL, αποθηκευμένα σε θερμοκρασία ψυγείου, με τη συσκευή microSENSESlab.

Γενικές παρατηρήσεις

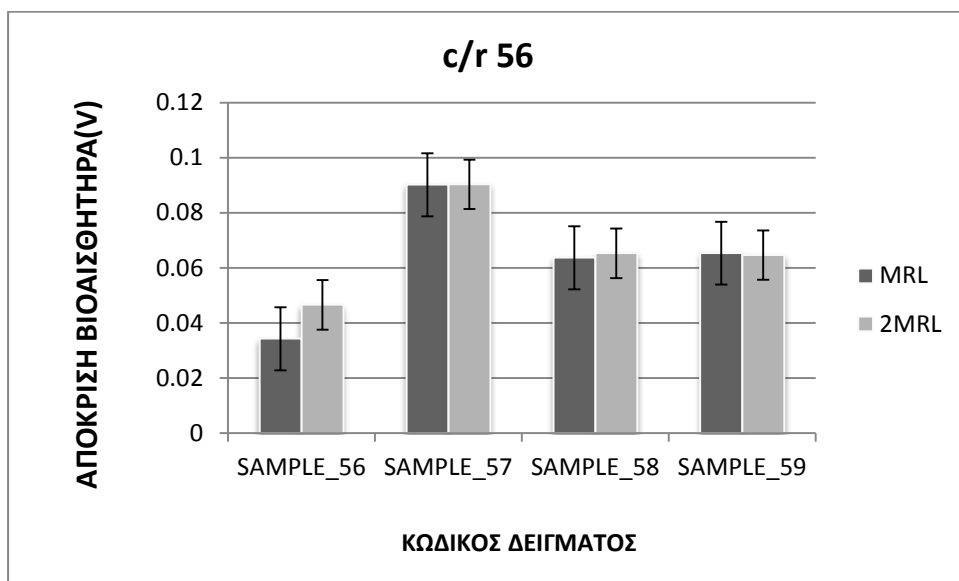
Στο σύνολο των μετρήσεων οι αποκρίσεις των διπλά τροποποιημένων βακτηρίων (με δύο αντισώματα) δεν ξεφεύγουν από τον μάρτυρα.

Παρόλα αυτά, παρατηρούμε ότι, στις περισσότερες περιπτώσεις, όταν το διάλυμα προς αναγνώριση περιείχε και τα δύο ανάλογα των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την τροποποίηση, ο βιοαισθητήρας συμπεριφερόταν σαν μοναδιαίος αισθητήρας (με ένα αντίσωμα).

5 Cross-reactivity(c/r)

Στον χειρισμό αυτό, η τροποποίηση των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε με ένα μόνο αντίσωμα, αλλά μετρήθηκε η απόκριση του βιοαισθητήρα στα υπόλοιπα τρία φυτοφάρμακα.

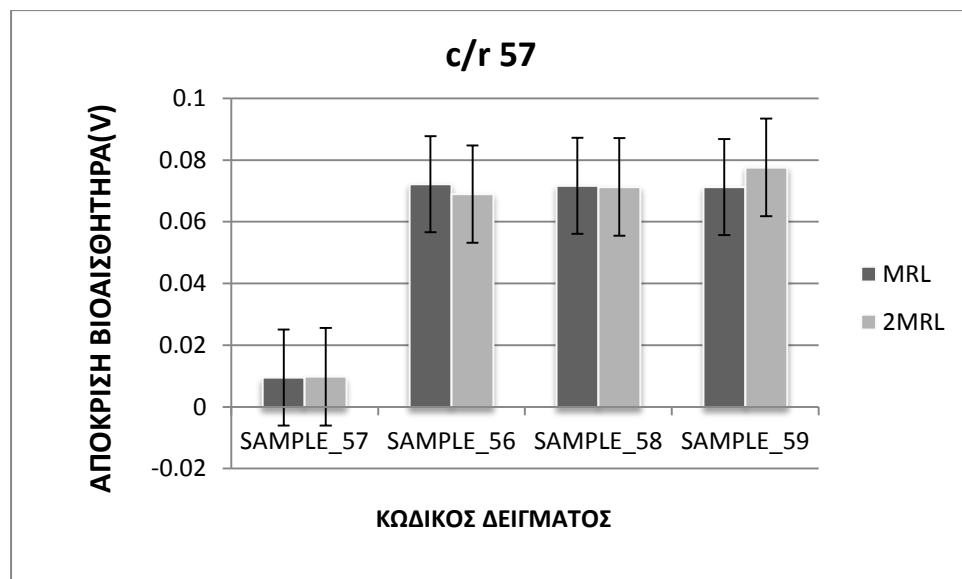
Τροποποίηση με Ab 56



Διάγραμμα 27: Μέσος όρος απόκρισης κυττάρων *Lactobacillus brevis* τροποποιημένα με αντισώματα MCPA, σε συγκεντρώσεις 1xMRL & 2xMRL, αποθηκευμένα σε θερμοκρασία ψυγείου, με τη συσκευή microSENSESlab-Απόκριση σε Triclopyr, Opp, Carbendazim

- Είναι φανερό ότι τα δείγματα 57, 58 και 59 δεν ανταποκρίνονται στα κύτταρα τροποποιημένα με το αντίσωμα 56 με τον ίδιο τρόπο που τα τελευταία αντιδρούν στο δείγμα 56 (δηλαδή με το αντίστοιχο τους αντιγόνο).

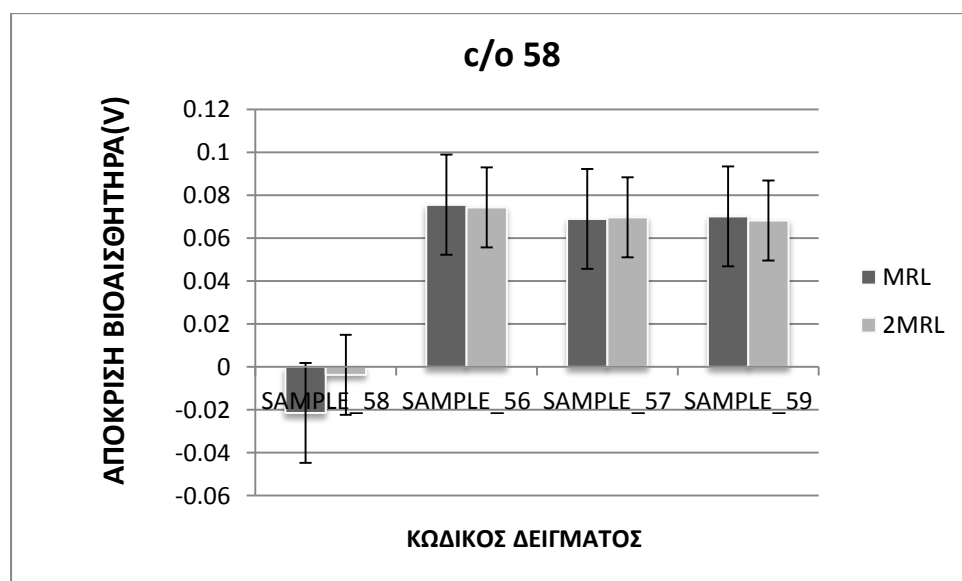
Τροποποίηση με Ab 57



Διάγραμμα 28: Μέσος όρος απόκριση κυτάρων *Lactobacillus brevis* τροποποιημένα με αντισώματα Triclorogr, σε συγκεντρώσεις 1xMRL & 2xMRL, αποθηκευμένα σε θερμοκρασία ψυγείου, με τη συσκευή microSENSElab-Απόκριση σε MCPA, Opp, Carbendazim.

- Με τον ίδιο τρόπο σκέψης, μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι το η απόκριση των κυτάρων τροποποιημένων με το αντίσωμα 57 έναντι του ομώνυμου δείγματος (57) διαφοροποιείται πλήρως από τα υπόλοιπα δείγματα.

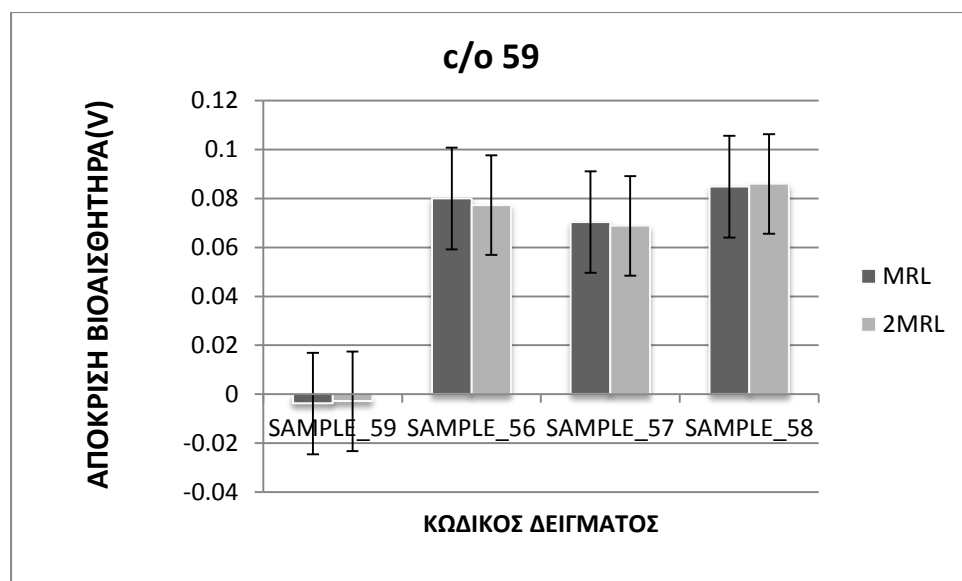
Τροποποίηση με Ab 58



Διάγραμμα 29: Μέσος όρος απόκριση κυτάρων *Lactobacillus brevis* τροποποιημένα με αντισώματα Opp, σε συγκεντρώσεις 1xMRL &

2xMRL, αποθηκευμένα σε θερμοκρασία ψυγείου, με τη συσκευή microSENSESlab-Απόκριση σε MCPA, Triclopyr, Carbendazim.

- Με τον ίδιο τρόπο σκέψης, μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι η απόκριση των κυττάρων τροποποιημένων με το αντίσωμα 58 έναντι του ομώνυμου δείγματος (58) διαφοροποιείται πλήρως από τα υπόλοιπα δείγματα.



Διάγραμμα 30: Μέσος όρος απόκρισης κυττάρων *Lactobacillus brevis* τροποποιημένα με αντισώματα Carbendazim, σε συγκεντρώσεις 1xMRL & 2xMRL, αποθηκευμένα σε θερμοκρασία ψυγείου, με τη συσκευή microSENSESlab-Απόκριση σε MCPA, Triclopyr, Opp.

- Παρομοίως, μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι η απόκριση των κυττάρων τροποποιημένων με το αντίσωμα 59 έναντι του ομώνυμου δείγματος (59) διαφοροποιείται πλήρως από τα υπόλοιπα δείγματα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα τελευταία χρόνια, έχει σημειωθεί αυξημένη χρήση φυτοπροστατευτικών ουσιών, σε παγκόσμια κλίμακα, γεγονός που καθιστά απαραίτητη την διεξαγωγή εντατικών και αποτελεσματικών ελέγχων σε τρόφιμα και στο νερό, για την ανίχνευση υπολειμμάτων τέτοιων ουσιών, προκειμένου να προστατευτεί η δημόσια υγεία. Σχετική μελέτη που έγινε στην Ευρωπαϊκή Ένωση και που αφορούσε τέτοιους ελέγχους, έδειξε ότι το 40% των εξεταζόμενων δειγμάτων τροφίμων που εξετάστηκαν, περιείχαν ανιχνεύσιμα υπολείμματα φυτοπροστατευτικών ουσιών, σε ποσότητες που υπερέβαιναν τα ανώτατα επιτρεπόμενα επίπεδα, (MRLs), κατά 3%. Σε αρκετά από τα δείγματα ανιχνεύτηκαν υπολείμματα οργανοφωσφορικών και καρβαμιδικών εντομοκτόνων, τα οποία, ως γνωστόν, παρουσιάζουν ιδιαίτερη τοξικότητα για τον άνθρωπο και ιδιαίτερα για τα βρέφη, γι' αυτό η Ευρωπαϊκή Ένωση έθεσε πολύ χαμηλότερα όρια ανίχνευσης, (10μg/kg), για τις φυτοπροστατευτικές αυτές ουσίες στις παιδικές τροφές [Schulze et.al., 2002]. Συνεπώς, η ανάπτυξη γρήγορων, ευαίσθητων και αξιόπιστων μεθόδων ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού υπολειμμάτων τέτοιων ουσιών, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Μέχρι πρόσφατα, ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των υπολειμμάτων των ουσιών αυτών, είχε περιοριστεί στην χρήση κλασικών τεχνικών της αναλυτικής χημείας, όπως χρωματογραφικών και φασματοσκοπικών τεχνικών. Παρόλο που οι μέθοδοι αυτοί παρουσιάζουν υψηλή ευαισθησία, είναι χρονοβόρες και απαιτούν την παρουσία εξειδικευμένου και έμπειρου προσωπικού, όπως επίσης και την χρήση υψηλού κόστους εξοπλισμού. Επιπλέον, δεν έχουν την ικανότητα διεξαγωγής αναλύσεων τοξικών ουσιών, επί τόπου και σε πραγματικό χρόνο. Οι περιορισμοί που χαρακτηρίζουν τις τεχνικές αυτές, οδήγησαν στην ανάγκη ανάπτυξης νέων αναλυτικών εργαλείων, που θα μπορέσουν να διεξάγουν γρήγορους, επιτόπιους και σε πραγματικό χρόνο, ελέγχους τοξικών ουσιών. Αναπτύχθηκαν πολλοί τύποι βιοαισθητήρων, οι οποίοι αποτελούν, πλέον, δυναμικά εργαλεία στα πεδία των τοξικολογικών και περιβαλλοντικών ελέγχων. Η μεγαλύτερη πρόκληση που έχουν να αντιμετωπίσουν τα βιοαναλυτικά συστήματα, είναι η ικανότητα διαχωρισμού μεταξύ ποικίλων τοξικών ουσιών. Παρόλο που οι πληροφορίες που αφορούν την γενική

τοξικότητα μιας αναλυτέας ουσίας μπορεί να είναι χρήσιμες για την κατηγοριοποίησή της, είναι επίσης επιθυμητή και η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των τοξικών ουσιών που εξετάζονται, κάτι που αποδεικνύεται δύσκολο, καθώς πολλές τοξικές ουσίες προκαλούν παρόμοιες μεταβολές στο παραγόμενο σήμα.

Οι βακτηριακοί βιοαισθητήρες, αποτελούν ένα τύπο βιοαισθητήρα, που διαχειρίζονται τροποποιημένα βακτήρια ως αισθητήρια στοιχεία. Η χρήση βακτηρίων παρέχει υψηλή ευαισθησία σε μεγάλο εύρος βιολογικά ενεργών ουσιών που επηρεάζουν την κυτταρική λειτουργία. Χαρακτηρίζονται από γρήγορη απόκριση σε διάφορα μόρια, κατά ένα αναπαραγωγίσιμο τρόπο, ανάλογα με την μεταβολή μεμβρανικού δυναμικού και όχι βάσει της δομής τους ή των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους, όπως συμβαίνει με τις χρωματογραφικές και φασματοσκοπικές μεθόδους. Η ευαισθησία σε συνδυασμό με την ευκολία χρήσης, και το χαμηλό τους κόστος αποτελούν κάποια από τα πλεονεκτήματά τους.

Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, έχει ήδη χρησιμοποιηθεί αξιοσημείωτος αριθμός διατάξεων βιοαισθητήρων διαφορετικού τύπου, που στοχεύουν στην ανίχνευση τοξικών ουσιών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, η χρήση αισθητήρα βασισμένου σε κυτάρων Vero-Ab55 για την ανίχνευση της 2,4,6-τριχλωροανισόλης(TCA), μιας ουσίας παράγωγο δράσης μυκήτων σε φελλούς κρασιών, που αλλοιώνει την γεύση του κρασιού και υποβαθμίζει την ποιότητα του [Apostolou et al., 2014].

Επίσης, στη βιβλιογραφία αναφέρεται η ανάπτυξη ενός κυτταρικού βιοαισθητήρα, βασισμένου στην αρχή της BERA, για την ανίχνευση υπολειμμάτων οργανοφωσφορικών και καρβαμιδικών φυτοφαρμάκων σε επιλεγμένα υποστρώματα λαχανικών [Mavrikou et al. 2008, Flampouri et al. 2010]. Ο αισθητήρας αυτός βασίστηκε στην δραστηριότητα της χολινεστεράσης σε κύτταρα νευροβλαστώματος, επιτρέποντας έτσι την επιλεκτική ανίχνευση υπολειμμάτων των φυτοφαρμάκων σε συγκεντρώσεις, χαμηλές έως 1 μέρος στο τρισεκατομμύριο (ppt). Στην περίπτωση αυτή, το βασικό μειονέκτημα του συστήματος ανίχνευσης, είναι η χρήση ενός εμπειρικού τρόπου για να καθοριστεί η παρουσία ενός φυτοφαρμάκου σε ένα

δείγμα, μέσω εξέτασης της καμπύλης απόκρισης του βιοαισθητήρα. Αυτό οφείλεται στην ευρεία ανταπόκριση σε δομικά διαφορετικές αναλυτές ουσίες, δηλαδή στην ικανότητα των νευρικών κυττάρων να αντιδρούν με τον ίδιο τρόπο, έναντι σε πληθώρα διαφορετικών μορίων. Για το λόγο αυτό, παρόλο που τα ευκαρυωτικά κύτταρα αποτελούν πολύτιμο εργαλείο στην ανίχνευση ουσιών, λόγω της ευαισθησίας τους (πολλές φορές προς ένα μοναδικό μόριο-στόχο), η εφαρμογή τους περιορίζεται αρκετά λόγω μικρής επιλεκτικότητας.

Σε δοκιμές τοξικότητας, για παράδειγμα, οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες ανιχνεύουν επιτυχώς την παρουσία ενός τοξικού συστατικού, αλλά γενικότερα αποτυγχάνουν να προσδιορίσουν την ακριβή φύση της τοξικής αναλυτέας ουσίας [Van der Lelie et al. 1997; Riska et al. 1999]. Για το λόγο αυτό, έχουν αναπτυχθεί ορισμένες μέθοδοι επιμόλυνσης κυττάρων με σκοπό την αύξηση της εξειδίκευσης τους, όπως η μέθοδος με βάση την κυτταρική πρόσληψη του ξένου DNA από, κυρίως, ανθρώπινα κύτταρα Β, που ως εκ τούτου οδηγούν στην έκφραση των μεμβρανικά συνδεδεμένων υποδοχέων [Rider et al. 2003, Banerjee and Bhunia 2009]. Παρόλα αυτά, η εφαρμογή τέτοιων μεθόδων περιορίζεται αρκετά λόγω μειωμένης σταθερότητας και λόγω της συχνής, μα ανεπιθύμητης μετατροπής του κυτταρικού φαινοτύπου.

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκαν βακτηριακοί βιοαισθητήρες, βασισμένοι σε βακτήρια *Lactobacillus brevis* και έγινε εφαρμογή της μεθόδου βιοηλεκτρικής αναγνώρισης, (BERA). Η αρχή λειτουργίας στην οποία βασίστηκε η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε, είναι ότι η παρουσία των φυτοφαρμάκων προκαλεί μεταβολές στο μεμβρανικό δυναμικό των τροποποιημένων βακτηρίων και ανιχνεύεται ως ηλεκτρικό σήμα στην συσκευή μέτρησης. Η διαφορά αυτή του δυναμικού δεν αποτελεί αναλογική αύξηση ή μείωση της ποσότητας του φυτοφαρμάκου στο προς μέτρηση δείγμα αλλά μια ένδειξη της απουσίας ή της παρουσίας του.

Γίνεται έκδηλο, από τα παραπάνω ότι οι περιορισμοί που καθιστούν τους μέχρι τώρα υπάρχοντες βιοαισθητήρες δύσκολους στο χειρισμό είναι αρκετοί. Συγκεκριμένα, αφορούν στην μειωμένη ικανότητα αποθηκευσιμότητας μετά την τροποποίηση με κατάλληλο αντίσωμα, στην παρόμοια απόκριση έναντι διαφορετικών ουσιών και λόγω αυτών των μειονεκτημάτων, στην αύξηση του

κόστους αλλά και στην ιδιαιτερότητα του τρόπου χειρισμού και αποθήκευσης (υψηλός κίνδυνος επιμολύνσεων).

Για το λόγο αυτό, στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκαν βακτήρια ως βιολογικό υλικό του βιοαισθητήρα, έναντι άλλων τύπων κυττάρων. Τα βακτήρια προσφέρουν εναλλακτική λύση στα προαναφερθέντα προβλήματα, αφού μειώνεται αισθητά το κόστος ανάπτυξης και αποθήκευσης. Επίσης, αυξάνεται η αποθηκευσιμότητα και η ευκολία χειρισμού και μεταφοράς τους, δίνοντας την δυνατότητα φορητότητας και μερικής αποσύνδεσης από τον εργαστηριακό χώρο [Willardson B., 1998 ; Tecon R., 2008]

Από τους πειραματικούς χειρισμούς που πραγματοποιήθηκαν, προκύπτει πως ο χρόνος και η θερμοκρασία αποθήκευσης, επηρεάζουν την ικανότητα απόκρισης των βιοαισθητήρων. Ακόμα, φαίνεται ότι ανοίγεται ένα νέο πεδίο έρευνας για ανάπτυξη διδύναμων (και πιθανώς πολυδύναμων) βιοαισθητήρων, που θα έχουν την ικανότητα ανίχνευσης παραπάνω από μία ουσιών. Τέλος, σημαντικά πορίσματα προκύπτουν από τον χειρισμό της διασταυρούμενης επιλεκτικότητας, όπου βιοαισθητήρες που προορίζονται για ανίχνευση συγκεκριμένου μορίου, δοκιμάζονται σε εναλλακτικά μόρια, παραπλήσιας φύσης.

Συμπερασματικά, οι βακτηριακοί αισθητήρες προσφέρουν αρκετά πλεονεκτήματα έναντι άλλων κυτταρικών βιοαισθητήρων και αποτελούν ένα ερευνητικό πεδίο που χρήζει περαιτέρω έρευνας και πειραματισμού, με σκοπό την ανάπτυξη εύκολων και ταχύτατων αναλυτικών μεθόδων ανίχνευσης μορίων, ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις. Η ιδιαιτερότητα της φύσης τους, τους καθιστά εύχρηστους και προσβάσιμους σε ευρύ επιστημονικό κοινό, δίνοντας έτσι βάσεις για την ανάπτυξη και χρήση στην αγορά της ανάλυσης τοξικότητας είτε αυτή αφορά σε γεωργικά προϊόντα είτε στην προστασία τροφίμων και στην ασφάλεια του καταναλωτικού κοινού.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Apostolou, T.; Pascual, N.; Marco, M. P.; Moschos, A.; Petropoulos, A.; Kaltsas, G.; Kintzios, S., Extraction-less, rapid assay for the direct detection of 2,4,6-trichloroanisole (TCA) in cork samples. *Talanta* 2014, 125 (0), 336-340.
- Banerjee P. and Bhunia A. K. (2009). Mammalian cell-based biosensors for pathogen and toxins, *Trends in Biotechnology*, 27, 179-188.
- Bedair S. S., Fedder G. K. (2002). Microcantilever Gas Chemical Sensors with Multi-modal Capability. Department of Electrical & Computer Engineering and the Robotics Institute.
- Bedioui (1999) *Advances in Biosensors: Perspectives in Biosensors*.
- Cunningham B., Lin B., Qiu J., Li P., Pepper J., Hugh J., (2002). A plastic colorimetric resonant optical biosensor for multiparallel detection of label-free biochemical interactions, *Sensors and Actuators B* 85, 219-226
- Chassy Bruce M., Annick Mercenier and Jeannette Flickinger, (1988). Transformation of bacteria by electroporation, *TIBTECH - DECEMBER* [Vol. 6].
- Eggins B. R., (2002). Chemical sensors and biosensors. *Medical and Biological Applications*.
- ΕΣΥΦ-Ελληνικός Σύνδεσμος Φυτοπροστασίας., (2000). Οδηγός για τα Υπολείμματα Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων στα Προϊόντα Φυτικής Προέλευσης.
- Flampouri E., Mavrikou S., Kintzios S., Miliadis G., Aplada-Sarli P. (2010). Development and Validation of a Cellular Biosensor Detecting Pesticide Residues in Tomatoes, *Talanta*, 80, 1799-1804.
- Fraden J., (2004). Third Edition of *Handbook of Modern Sensors: physics, designs, and applications*, Chapter 1.
- Ganapathy C.,(1997). Environmental Fate Of Triclopyr, *Environmental Monitoring*

& Pest Management Branch Department of Pesticide Regulation
Sacramento, CA.

Gimeno O., Plucinski P., Kolaczowski S., (2003). Removal of the Herbicide MCPA by commercial activated carbons: equilibrium, kinetics , and reversibility, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 42, 1076-1086.

Grieshaber D[†]., MacKenzie R[†]., Vörös J., Reimhult E., (2008). *Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures*.

Hulanicki A., Glab S., Ingman F., (1991). Chemical Sensors - Definitions and classifications. *International Union of Pure and Applied Chemistry*, Vol. 63, No 9, pp. 1247-1250.

Kandler, O. 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria *Ant. v. Leeuwenhoek*, vol. 49, pp. 209–224.

Kandler, O.; N. Weiss. 1986. Regular, non-sporing Gram-positive rods, p. 1208–1234. In: P. H. A. Sneath, N. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2. William and Wilkins, Baltimore.

Καπετανάκης Ευάγγελος (2003). Μέθοδοι αντιμετώπισης φυτοπαράσιτων. σ. 9-13

Karube, I., Okada, T., Suzuki, S. (1981). Amperometric Determination of Ammonia Gas with Immobilized Nitrifying Bacteria, *Anal. Chem.* 53(12): 1852-1854.

Keusgen M. (2002). Biosensors: new approaches in drug discovery. *Naturwissenschaften* 89:433-444.

Kintzios, S. (2007). Cell-based Biosensors in Clinical Chemistry. *Mini-reviews in Medical Chemistry* 7: 1019-1026.

Kintzios S, (2009) Biosensors in Food Safety Control: an update. In: *Biosensors: Properties, Materials and Applications* (Ed. F. Columbus). Nova Science

Publishers, Hauppauge, NY.

Kintzios S. (2014) Mammalian cell-based sensors for high throughput screening for detecting chemical residues, pathogens and toxins in food. Chapter 7, The University of Memphis, USA

Kintzios, S., Pistola, E., Konstas, J., Matakidiadis, T., Alexandropoulos, N., Bem, F., Biselis, J., Levin, R., (2001b). Application of the Bioelectric Recognition Assay (BERA) on the detection of human and plantviruses. *Biosens. Bioelectron.* 16: 467–480.

Kintzios, S., Pistola, E., Panagiotopoulos, P., Bomsel, M., Alexandropoulos, N., Bem, F., Ekonomou, G., Biselis, J., Levin, R. (2001a). Bioelectric recognition assay (BERA). *Biosensors & Bioelectronics* 16: 325-336.

Kitagawa, Y., Tamiya, E., Karube, I., (1987). Microbial-FET Alcohol Sensor. *Annal. Lett.* 20(1): 81-96.

Kokla, A., Blouchos, P., Livaniou, E., Zikos, C., Kakabakos, S., Petrou, P., Kintzios S. (2013). Visualization of the membrane engineering concept: evidence for the specific orientation of electroinserted antibodies and selective binding of target analytes. *Wiley Online Library*, DOI: 10.1002

Lambrechts M., Sansen W. M. C., (1992). An introduction to microelectrochemical sensors. *Biosensors: Microelectrochemical Devices.*

Macholán L., Chmelíková B., Plant tissue-based membrane biosensor for l-ascorbic acid, *Analytica Chimica Acta*, Volume 185, 1986, Pages 187–193

Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J.(2005) Brock Βιολογία των μικροοργανισμών Τόμος I, p.467.

Makinwa K., (2008). Electronic Instrumentation Laboratory/DIMES, Delft University of Technology. Sensors for wireless sensor networks.

- Mansouri et al., (1998) Development of a Glucose Sensor and Its Inclusion in the GEM Blood Analyzer, International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine OmniPress.
- Mariné-Font, A., M. C. Vidal-Carou, M. Izquierdo-Pulido, M. T Venciana-Nogués, and T. Hernández-Jover. 1995. Les amines biogènes dans les aliments: leur signification, leur analyse. *Ann. Fals. Exp. Chim*, vol 88, pp. 11-140.
- Matsunaga, T., Karube, I., Suzuki, S. (1978). Rapid Determination of Nicotinic Acid by Immobilized *Lactobacillus arabinosus*. *Annal. Chim. Acta* 99(2): 233-239.
- Mavrikou S., Flampouri E., Moschopoulou G., Mangana O., Michaelides A., Kintzios S. (2008). Assessment of organophosphate and carbamate pesticide residues in cigarette tobacco with a novel cell biosensor, *Sensors*, 8, 2818-2832.
- Meadows D (1996) Recent developments with biosensing technology and applications in the pharmaceutical industry. *Adv Drug Deliv Rev* 21:179–189.
- Mehrvar M., Abdi M., (2004). Recent developments, characteristics and potential applications of electrochemical biosensors. *Analytical sciences*, Vol. 20, pp. 1113-1126.
- Middelhoek S. – Noorlag D.J.W, (1981) Three-dimensional representation of input and output transducers, *Sensors and Actuators*, 2, 29-41.
- Nagel, B., Dellweg, H., Gierasch, L.M. (1992). Glossary for chemists of terms used in biotechnology (IUPAC Recommendations 1992). *Pure Appl. Chem.* 64(1): 143-168
- Nasreddine L., Parent-Massin D. (2002). Food contamination by metals and pesticides in the European Union. Should we worry?
- Odata, T., Karube, I., Suzuki, S. (1993). Microbial Sensor System which uses *Methylomonas* sp. for the Determination of Methane. *Europ. J. Appl.*

Microbiol. Biotechnol. 12: 102-106

O'Neil M.J., ed. by (2001). Merck Index : an encyclopedia of chemicals, drugs, & biologicals : 13th ed. (13. ed. ed.). United States: MERCK & CO INC. p. 7388.

Perdikaris, A.(2011) Εφαρμογή αισθητήρων Βιοηλεκτρικής Αναγνώρισης (BERA) νεότερης γενιάς στην ιολογία, διδακτορική διατριβή

Perdikaris, A., Alexandropoulos, N., Kintzios, S. (2009). Development of a Novel, Ultra-rapid Biosensor for the Qualitative Detection of Hepatitis B Virus-associated Antigens and Anti-HBV, Based on “Membrane-engineered” Fibroblast 172 Cells with Virus-Specific Antibodies and Antigens. Sensors 9: 2176-86

Racek, J., (1991). A Yeast Biosensor for Glucose Determination. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34(4): 473-477.

Racek, J., Musil, J. (1990). Possibilities of Lactate Determination by Cell Biosensors. Proceedings of the Symposium on Bioanalytical Methods. pp 36-38, Prague, Czech Republic

Ramakrishna S., Lala N. L., Garudadhvaj H., Ramaseshan R., Ganesh V. K.. (2005). Polymer Nanofibers for Biosensor Applications. Chapter 15, pp. 377- 392.

Richards, M.; R. M. Macrae. 1964. The significance of the use of hops in regard to the biological stability of beer. II. The development of resistance to hop resins by strains of lactobacilli. J. Inst. Brewing, vol. 70, pp. 484–488.

Rider T. H., Petrovick M. S., Nagri F. E., Harper J. D., Schwoebel E. D., Mathews R. H., Blanchard D. J., Bortolin L. T., Young A. M., Chen J. and Hollis M. A. (2003). A B cell-based sensor for rapid identification of pathogens, Science, 301, 213-215.

- Riska P. F., Su Y., Bardarov S., Freulich L., Sarkis G., Hatful G., Carrière C., Kumar V., Chan J. and Jacobs W. R. Jr (1999). Rapid film-based determination of antibiotic susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* strains by using a luciferase reporter phage and the Bronx Box, *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 1144-1449.
- Robbens J., Maras M., Laureyn W., Blust R., De Coen W., (2005). Whole cell biosensors for (eco) toxicity screening: alternatives for the future. *NSTI – Nanotech*, Vol. 1, pp. 497-500.
- Schulze H., Schmid R. D., Bachmann T. T., (2002). Rapid detection of neurotoxic insecticides in food using disposable acetylcholinesterase-biosensors and simple solvent extraction.
- Taylor R. F., Schultz J. S., (1996). Introduction to chemical and biological sensors. *Handbook of Chemical and Biological Sensors*.
- Tecon R., Roelof van der Meer J. (2008) *Bacterial Biosensors for Measuring Availability of Environmental Pollutants*
- Van Der Lelie D., Regniers L., Borremans B., Provoost A. and Verschaeve L. (1997). The VITOTOX test, a SOS-bioluminescence *Salmonella typhimurium* test to measure genotoxicity, *Mutation Research*, 389, 279-290.
- Willardson B., Wilkins J.,[†] Rand T., Schupp J., Hill K., Keim P. and Jackson P. (1998). Development and Testing of a Bacterial Biosensor for Toluene-Based Environmental Contaminants
- Wollenberger, U., Scheller, F., Atrat, P. (1980). Microbial Membrane Electrode for the Determination of Cholesterol. *Annal. Lett.* 13: 825-836.
- Zieziulewicz T. J., Unfricht D. W., Hadjout N., Lynes M. A., Lawrence D. A., (2003). Shrinking the Biologic world – Nanobiotechnologies for toxicology. *Technological sciences*, Vol. 74, pp. 235-244.

Χαρίτου Μαρία, (1999) «Μελέτη της επίδρασης ηλεκτρικών πεδίων στη μεμβράνη ερυθροκυττάρων. Ηλεκτροπόρωση - Ηλεκτροσύντηξη και τεχνολογικές εφαρμογές»